

## DISSERTATION

# Design, Synthese und zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren onkogener und Wirkstoff-resistenter Mutanten der ErbB-Familie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften, Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

---

Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Vorgelegt von: Jonas Lategahn  
geb. 24.04.1989 in Witten

Dortmund, 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis Dezember 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh am Fachbereich für Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.





Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

J. Engel<sup>+</sup>, J. Lategahn<sup>+</sup>, D. Rauh. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 2-5.

J. Engel<sup>+</sup>, C. Becker<sup>+</sup>, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R.P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 10909-10912.

S. Tomassi<sup>+</sup>, J. Lategahn<sup>+</sup>, J. Engel, M. Keul, H.L. Tumbrink, J. Ketzer, T. Mühlenberg, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, S. Bauer, D. Rauh. Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2361-2372.

M. Günther<sup>+</sup>, J. Lategahn<sup>+</sup>, M. Juchum, E. Döring, M. Keul, J. Engel, H.L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer. Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 5613-5637.

J. Engel<sup>+</sup>, S. Smith<sup>+</sup>, J. Lategahn, H.L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J.G. Hengstler, D. Rauh. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 7725-7744.

J. Lategahn<sup>+</sup>, M. Keul<sup>+</sup>, D. Rauh. Lessons to be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 2307-2313.

J. Lategahn, et al. Inhibition of Osimertinib-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor EGFR-T790M/C797S – Insight into the Binding Characteristics of Pyrrolopyrimidines and Pyrrolopyrimidin-4-ones Derivatized Using the Mitsunobu Reaction. *Manuskript bereit zum Einreichen, Patentanmeldung ausstehend.*

---

<sup>+</sup> Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.



## DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung, den individuellen Gestaltungsspielraum, sowie die gute Betreuung während meiner Dissertation. Herrn Prof. Daniel Summerer möchte ich für die Übernahme des Koreferats meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Marina Keul, Julian Engel, Stefano Tomassi, Christian Becker und Luke Hodson, die gemeinsam mit mir an diesem Projekt gearbeitet haben und mich stets tatkräftig unterstützt und gefördert haben. Meinen Studenten Maren Flaßhoff, Philip Klövekorn, Hannah Tumbrink und Tobias Grabe möchte ich herzlich für ihre engagierte Arbeit an dem Projekt danken. André Richters, Svenja Mayer-Wrangowski, Debjit Basu und meinen Büropartnern Steven Smith und Julia Hardick danke ich für gemeinsames Brainstorming, anregende Diskussionen und ihre Unterstützung bei Problemlösungen. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Simone Eppmann und Andreas Arndt für ihre Hilfe im Labor und die Messung von unglaublich vielen biochemischen Daten, sowie Patrik Wolle für die Administration der LIMS-Datenbank und seine Geduld bei der Lösung von Soft- und Hardware-Problemen aller Art.

Vielen Dank an alle weiteren derzeitigen und ehemalige Kollegen aus der AG Rauh für die stets gute Zusammenarbeit und auch für die schöne Zeit außerhalb des Laboralltags: Niklas, Helena, Jasmin, Roberta, Matthias, Rajesh, Mike, Jörn, Bianca, Ina, Lena, Lisa, Janina, Marius und Kiru.

Ein besonderer Dank geht hierbei auch an unser Sekretariat: Martina Reibner, Petra Alhorn, Vanessa Hohmann, Ulrich Schoppe und Maria Sergani. Weiterhin gilt mein Dank den gemeinsamen Einrichtungen der Fakultät: Prof. Hiller und der NMR-Abteilung, Christiane Heitbrink und der HRMS-Abteilung, den Werkstätten, sowie Petra Janning und Jens Warmers vom MPI für die LC/MS-Messungen. Ohne eure Unterstützung wäre unsere Arbeit nicht möglich!

Ich bin sehr dankbar für viele fruchtbare Kooperationen und die Hilfe und Unterstützung der involvierten Mitarbeiter. Insbesondere zu nennen sind dabei Carsten Schultz-Fademrecht, Sascha Menninger und Matthias Baumann vom LDC, die Arbeitsgruppen um Prof. Thomas und Prof. Sos vom Uniklinikum Köln, sowie das gesamte PerMed- bzw. EMODI-Konsortium, Julia Ketzer, Thomas Mühlenberg und Prof. Bauer vom Uniklinikum Essen, Georgia Günther und Prof. Hengstler vom IfADo, Lucky Kollipara und René Zahedi vom ISAS, Marcel Günther und Prof. Laufer aus Tübingen, Hendrike Schütz vom MPI, Heike Rimpel und das COMAS, sowie Jana Jungkurth und die AG von Prof. Dehmelt.

Herzlichen Dank an meine Familie, Freunde, meine Freundin Svenja und alle, die mich auf meinem Weg unterstützt haben und mir stets Rückhalt gegeben haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1. Targets und Inhibitoren zur Behandlung von NSCLC	13
1.1.1. Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	14
1.1.2. Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Her2)	17
1.1.3. Anaplastische Lymphom-Kinase (ALK) und Mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor (MET)	19
1.2. Neue Ansätze zur Behandlung von NSCLC: Immuntherapie	20
1.3. Investigative und neue Inhibitoren von mutiertem EGFR	21
<b>2. Motivation und Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>25</b>
3.1. Etablierung zellulärer Testsysteme zur Bewertung von Inhibitoren der ErbB-Familie	25
3.2. Entwicklung von Inhibitoren zur Umgehung von Wirkstoff- Resistenzen in EGFR	31
3.2.1. Einblicke in die Anforderungen an viert-Generations TKIs	31
3.2.2. Optimierung der Bindungsgeometrie von kovalenten TKIs	39
3.2.3. Potential von Inhibitoren erhalten durch Target-Hopping	49
3.2.4. Selektive TKIs erhalten durch Mitsunobu-basierte Derivatisierung und Einblicke in deren Bindungscharakteristiken	58
3.2.5. Analyse der inhibitorischen Aktivität gegenüber Osimertinib- resistenten Zellen	76
3.3. Entwicklung von Inhibitoren des Her2 und EGFR mit Mutationen in Exon20	83
3.3.1. Substanzdurchmusterung-basierte Entwicklung von TKIs	83
3.3.2. Potential von Pyrrolopyrimidin-basierten TKIs gegenüber Exon20-Mutanten	95
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>5. Summary and Outlook</b>	<b>99</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>101</b>
<b>7. Experimenteller Teil</b>	<b>113</b>
7.1. Zellkultur	113
7.1.1. Auftauen von kryokonservierten Zellen	113
7.1.2. Zellkultivierung	113
7.1.3. Passagieren von Zellen	113

7.1.4. Einfrieren von Zellen	114
7.2. Zellulärer CellTiter-Glo Viabilitäts-Assay	114
7.2.1. Zellzahlbestimmung	114
7.2.2. Zellzahloptimierung	114
7.2.3. Zellviabilitätsassay zur Bestimmung des EC <sub>50</sub> -Wertes	114
7.3. Western Blotting	115
7.4. Aktivitäts-basierter Assay zur IC <sub>50</sub> -Bestimmung und Charakterisierung der Bindungskinetik	116
7.5. Kristallisierung, Strukturbestimmung und Refinement von cSrc- T338M/S345C	117
7.6. Massenspektrometrische Untersuchungen	118
7.7. Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter	119
7.7.1. Mikrosomen-Stabilitäts Assay (Phase I)	119
7.7.2. Plasma-Stabilitäts Assay	119
7.7.3. Plasma-Protein-Bindung	120
7.7.4. PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay)	120
7.7.5. Caco-2 Assay	120
7.7.6. <i>in vivo</i> -Pharmakokinetik	120
7.8. Organische Synthese	121
7.8.1. Allgemeine Anmerkungen	121
7.8.2. Synthesevorschriften	122
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>217</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)</b>	<b>235</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
ALK	Anaplastische Lymphom-Kinase
Amp.	Amplifikation
AUC	Flächeninhalt unter der Kurve (engl. <i>Area under the curve</i> )
BRSM	basierend auf re-isoliertem Startmaterial
BTK	Bruton's Tyrosin-Kinase
CL <sub>int</sub>	intrinsische Clearance
Cpd	Verbindung (engl. <i>compound</i> )
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated
cSrc	engl. <i>cellular sarcoma</i>
CTG	CellTiter-Glo Assay
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
1,2-DCE	1,2-Dichlorethan
del	Deletion
delins	Deletionsinsertion
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DME	1,2-Dimethoxyethan
EAI	EGFR allosterischer Inhibitor
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EML4	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
ErbB	Erythroblastisches Leukemie Viral-homologes Onkogen
GSK	GlaxoSmithKline
Her2/3/4	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2/3/4
HLM	humane Leber-Mikrosomen
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>

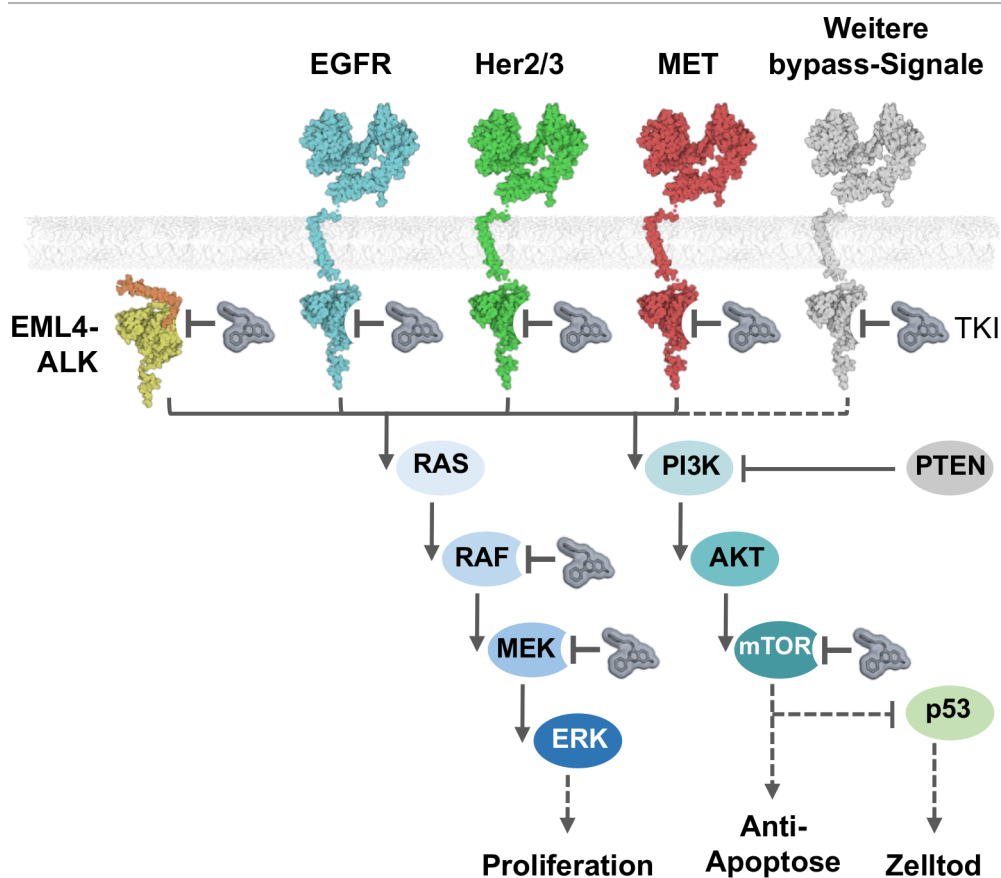
HPLC	hochleistungs-Flüssigchromatographie
HTRF	homogene Zeit-aufgelöste Fluoreszenz
ins	Insertion
IP	intraperitoneal
IV	intravenös
kRas	engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i>
LLE	Liganden Lipophilizitäts-Effizienz
MD	Molekulardynamik
MET	mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor
MLM	Maus Leber-Mikrosomen
$\mu$ w	Mikrowellenstrahlung
n.b.	nicht bestimmt
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
PAMPA	engl. <i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
PD-1/PD-L1	engl. <i>programmed death-1/programmed death ligand-1</i>
PO	peroral
pyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
quant.	quantitativ
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAR	Struktur–Aktivitäts-Beziehung
SEM-Cl	[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methylchlorid
$S_NAr$	nukleophile aromatische Substitution
TFA	Trifluoressigsäure
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
WT	Wild-Typ



## 1. EINLEITUNG

Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC) ist die häufigste Ursache für Krebs-bezogene Todesfälle weltweit.<sup>[1]</sup> Die Behandlung von NSCLC hat jedoch in den letzten zehn Jahren eine Revolution erfahren: Die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern und ein detailliertes Verständnis von deren biochemischen und molekularen Eigenschaften erlaubte die Entwicklung von zielgerichteten, spezifischen Inhibitoren der mutierten Onkoproteine. Diese sogenannte Präzisionsmedizin stellt einen alternativen Behandlungsansatz zur zytotoxischen Chemotherapie dar und führte bei entsprechend behandelten Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebensraten und der Lebensqualität.<sup>[2,3]</sup> Während die mittlere Überlebensrate im Jahr 2000 noch bei acht Monaten nach Diagnose lag, konnte diese so auf bis zu 30 Monate im Jahr 2014 gesteigert werden.<sup>[4,5]</sup> Die Entstehung von Resistenzen gegen die Behandlung mit zielgerichteten Therapeutika ist allerdings unumgänglich und erfordert die stetige Aufklärung der Resistenzmechanismen, sowie die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

### 1.1. Targets und Inhibitoren zur Behandlung von NSCLC

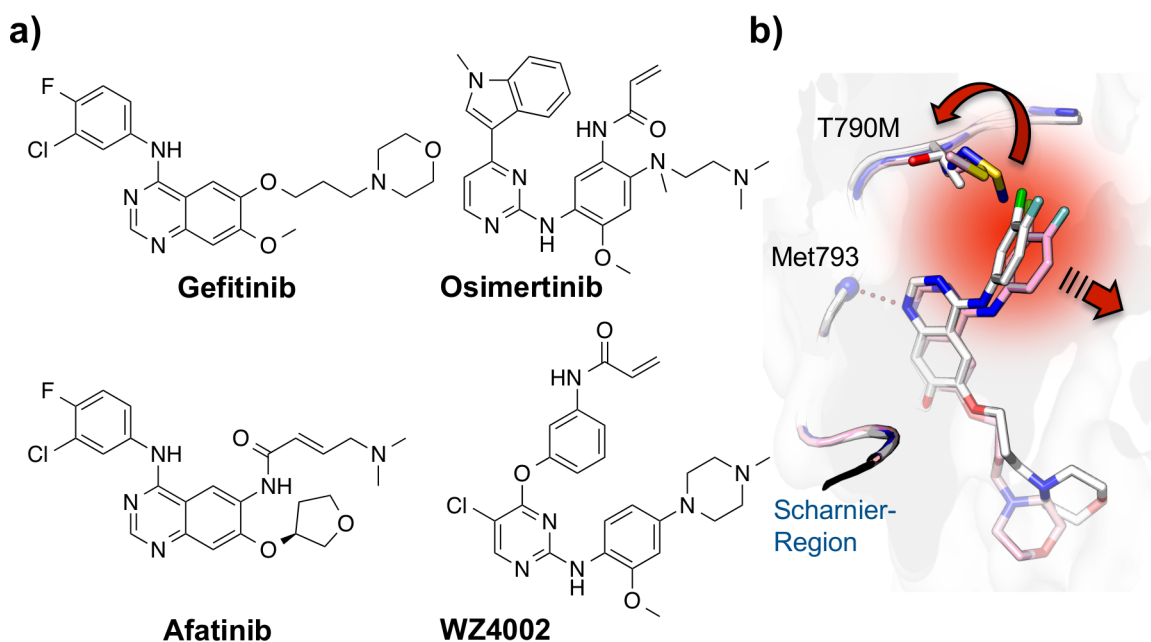


**Abbildung 1.** Zielproteine und Behandlungsoptionen mit TKIs des NSCLC, sowie die Signalkaskaden, die an der Entstehung von Lungenkrebs maßgeblich beteiligt sind.<sup>[6]</sup>

Genetische Läsionen, die zur Entstehung von Krebs führen werden meist als Treiber-Mutationen bezeichnet und treten bei NSCLC häufig in den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), Her2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2) und ALK (anaplastische Lymphom-Kinase) auf.<sup>[7]</sup> Durch Überaktivierung der Signalkaskaden RAS-RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT-mTOR wird die Proliferation der betroffenen Zellen gesteigert und es kommt zur Entstehung von Krebs (Abbildung 1).<sup>[8]</sup>

### 1.1.1. Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit EGFR und Her2, welche neben Her3 und Her4 zur ErbB-Familie gehören. In EGFR wurden aktivierende Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne identifiziert, wobei die häufigsten die Deletion delE746\_A750 in Exon19 und die Punktmutation L858R (Exon21) darstellen.<sup>[9,10]</sup> Leu858 befindet sich innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne und stabilisiert die regulatorische Helix  $\alpha$ C durch hydrophobe Kontakte in der inaktiven Konformation. Durch die Mutation zum polaren Arg858 wird dieses innerhalb der Aktivierungsschleife stabilisiert und begünstigt die Helix, sowie die Aktivierungsschleife in ihrem jeweiligen aktiven Zustand und verschiebt damit das Gleichgewicht in Richtung der aktiven Konformation.<sup>[11]</sup> Abbildung 4a zeigt die Helix C in beiden Zuständen. Die molekularen Grundlagen der Deletions-Mutation sind nicht im Detail geklärt, jedoch legen MD-Simulationen nahe, dass eine verkürzte Schleife am Ende der Helix eine dem aktiven Zustand ähnliche Konformation bewirkt. Studien an Deletions-Mutanten zeigen weiterhin eine veränderte hydrophobe Sub-Tasche, die mit der Bindung von Typ II oder Typ III Kinase-Inhibitoren nicht kompatibel ist.<sup>[12]</sup> Typ I Inhibitoren, wie Gefitinib<sup>[13,14]</sup> oder Afatinib<sup>[15,16]</sup> (Abbildung 2a) sind jedoch sensitiv gegenüber diesen Mutationen und für die Behandlung von NSCLC zugelassen.<sup>[17-19]</sup> In diesem Kontext wurde eine verringerte Affinität dieser Mutanten für ATP festgestellt, was die Besetzung der Bindetasche durch niedermolekulare Inhibitoren begünstigt.<sup>[20]</sup> Während Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) der ersten Generation, wie Gefitinib, eine starke Konkurrenz mit dem Co-Faktor ATP aufweisen, wurden Inhibitoren der zweiten Generation, wie Afatinib, entwickelt um eine kovalente, irreversible Bindung mit der Kinase auszubilden und sind daher von der Verdrängung durch ATP weniger betroffen. Diese bringen dazu ein Elektrophil in räumliche Nähe zum reaktiven Cystein an Position 797, welche in einer Michael-Addition miteinander reagieren. Dadurch wird die Verweildauer des Wirkstoffs in der Bindetasche maximal groß und die Wiederherstellung eines aktiven EGFR-Signals kann nur durch neu-Synthese des Rezeptors erfolgen.<sup>[21,22]</sup> Außerdem zeigt Afatinib ein breiteres Inhibitionsspektrum, welches das ErbB-Mitglied Her2 einschließt.<sup>[16]</sup>

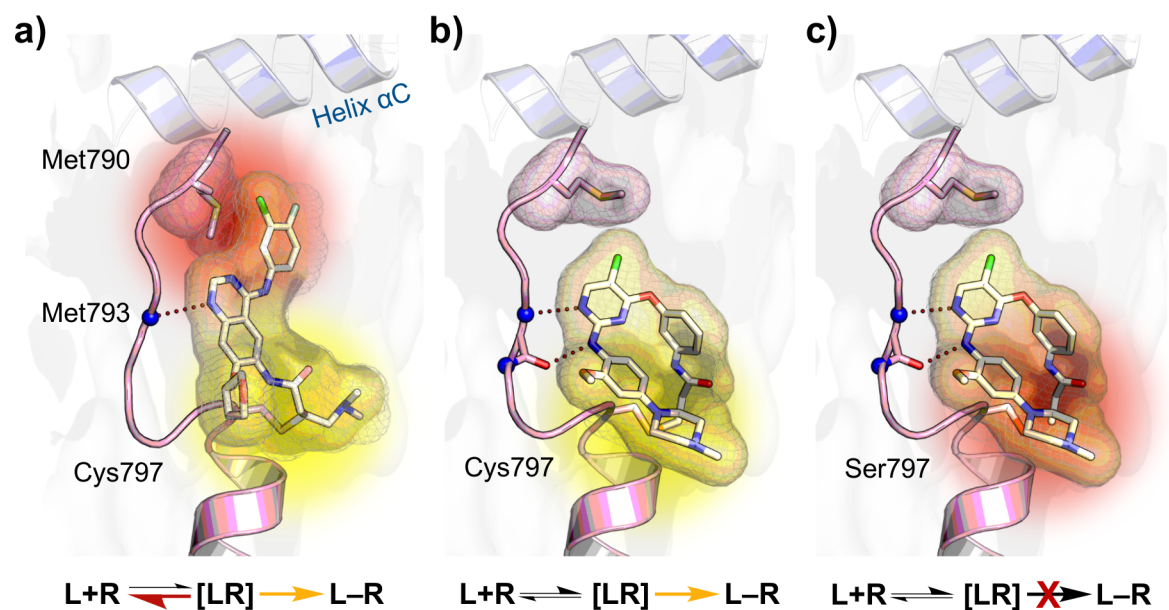


**Abbildung 2.** a) Repräsentative chemische Strukturen der drei EGFR TKI-Generationen. b) Illustration der sterischen Abstoßung von 4-Anilino-Chinazolin durch Mutation der Türsteher-Aminosäure (T790M). Der Bindungsmodus von Gefitinib in EGFR Wild-Typ (weiß, PDB ID: 2ITY) führt zu sterischer Hinderung mit der Methionine Seitenkette (blau, PDB ID: 3UG1), resultierend in einer ungünstigen Bindungs-Pose (pink, PDB ID: 3UG2).<sup>[23]</sup>

Patienten mit aktivierenden Mutationen des EGFR zeigen gute Ansprechraten von 50–80% auf die Therapie mit Inhibitoren der ersten Generation,<sup>[17-19]</sup> jedoch treten innerhalb des ersten Jahres der Behandlung Resistenzen auf, die in 60% der Fälle durch Mutation der Türsteher-Aminosäure (T790M) hervorgerufen werden.<sup>[24,25]</sup> Die sterisch anspruchsvollere Methionin-Seitenkette interferiert mit dem 4-Anilino-Substituenten der Chinazolin-basierten Wirkstoffe. Analysen von Kristallstrukturen zeigten, dass der Inhibitor daher einen ungünstigen Bindungsmodus einnimmt und die Seitenkette des Methionin-Türstehers ebenfalls eine leicht veränderte Konformation aufweist (Abbildung 2b).<sup>[23,26,27]</sup> Zusätzlich wurde eine erhöhte ATP-Affinität für diese mutierte Variante des EGFR nachgewiesen, die der Bindung reversibler Inhibitoren entgegenwirkt.<sup>[20]</sup> Inhibitoren der zweiten Generation umgehen zwar die ATP-Kompetition durch kovalente Alkylierung der Bindetasche, jedoch basieren diese auf dem gleichen substituierten Grundgerüst (Abbildung 3a) und zeigten dementsprechend nur geringe Wirksamkeit in Patienten mit EGFR-T790M. Außerdem zeigen beide Wirkstoff-Generationen *On-Target*-Toxizität durch Inhibition des EGFR Wild-Typ (WT), wodurch Nebenwirkungen, wie Durchfall, Hautausschlag und Juckreiz hervorgerufen werden. Diese begrenzen bei der Behandlung von Türsteher-mutiertem EGFR das Erreichen von klinisch wirksamen Konzentrationen im Tumor.<sup>[28,29]</sup>

Es wurde deutlich, dass drei Faktoren entscheidend sind, um die Wirkstoff-Resistenz T790M zu umgehen: (i) Entwicklung von Inhibitoren unter Verwendung

von neuen Grundgerüsten, (ii) spezifische Adressierung der mutierten Variante mit Selektivität gegenüber EGFR-WT und (iii) kovalente Alkylierung von Cys797.<sup>[23]</sup> Basierend auf diesen Überlegungen wurden Inhibitoren der dritten Generation entwickelt, welche ein Pyrimidin-Grundgerüst aufweisen, wie z.B. Osimertinib<sup>[30-32]</sup> (Abbildung 2a). Diese Wirkstoffe umgehen den sterischen Konflikt mit der Türsteher-Seitenkette und binden mit einem Acrylamid kovalent an das reaktive Cystein durch die räumliche Nähe der reaktiven Partner (Abbildung 3b). Klinische Studien mit diesen TKIs, zeigten gute Ansprechraten und Überlebensraten in T790M-positiven Patienten und konnten hoch dosiert ohne limitierende Nebenwirkungen verabreicht werden.<sup>[33,34]</sup> Die positiven klinischen Ergebnisse der Inhibitoren der dritten Generation verdeutlichen, dass nur das richtige Verständnis der molekularen Eigenschaften des Zielproteins, beziehungsweise des Biomarkers, die Entwicklung von effizienten präzisions-Therapeutika ermöglicht.<sup>[6,23]</sup>



**Abbildung 3.** Bindungsmodus von kovalenten EGFR Inhibitoren. **a)** 4-Anilino-Chinazoline, wie Afatinib, weisen einen sterischen Konflikt mit dem Methionin-Türsteher auf (rot) (PDB ID: 4G5P). **b)** Pyrimidin-basierte Inhibitoren der dritten Generation, wie WZ4002 umgehen den sterischen Konflikt und basieren auf der kovalenten Alkylierung von Cys797 (gelb) (PDB ID: 3IKA). **c)** Mutation des Cys797 zum weniger nukleophilen Serin vermittelt Resistenz gegenüber Inhibitoren der dritten Generation (Modell, basierend auf PDB ID: 3IKA).<sup>[23]</sup>

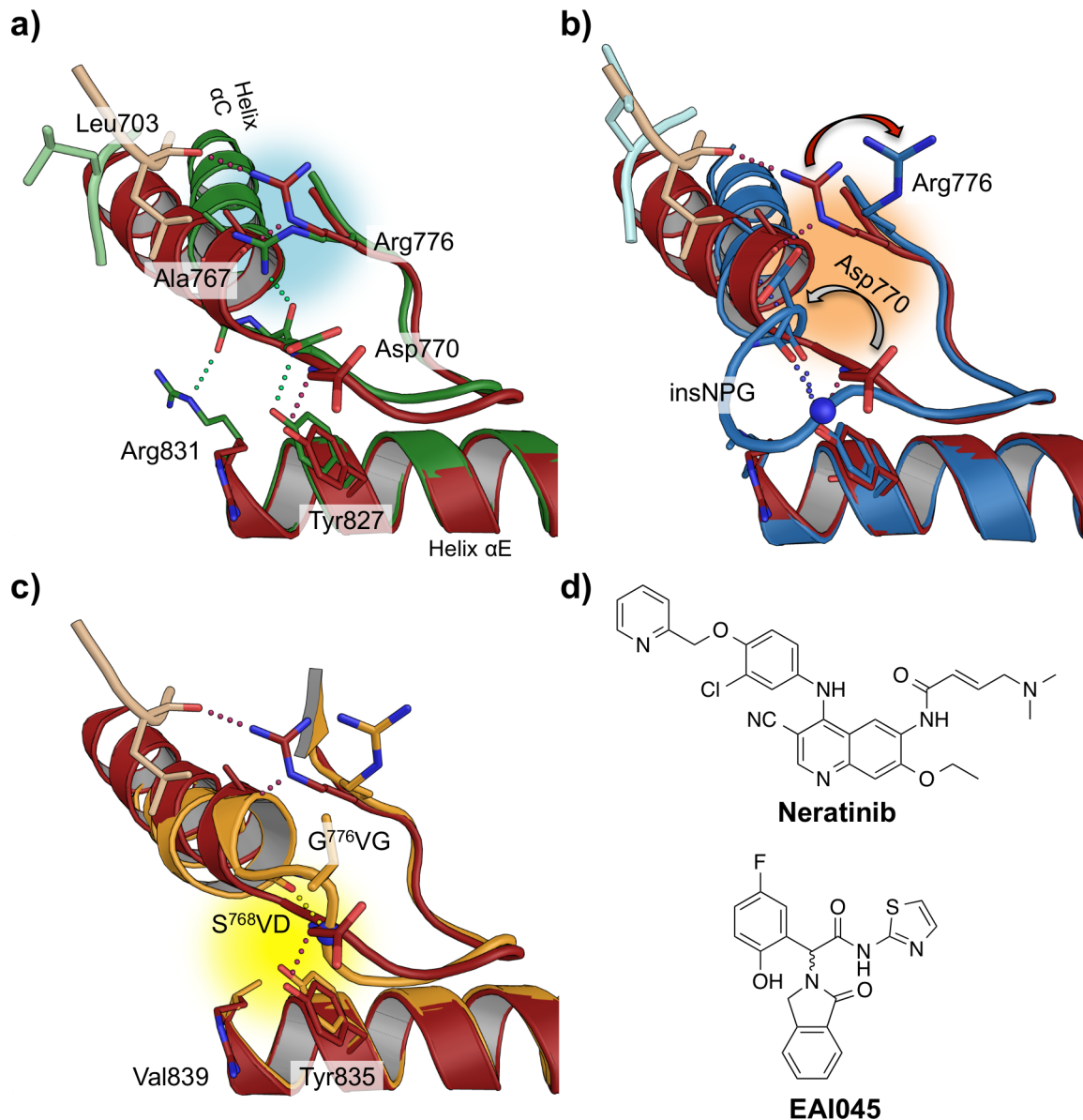
Innerhalb des ersten Jahres der Behandlung mit Wirkstoffen, wie Osimertinib, tritt in Patienten erneutes Tumorwachstum auf. Der Großteil der Resistenz-Mechanismen gegenüber Inhibitoren der dritten Generation wird vermittelt durch den Verlust der T790M-Mutation.<sup>[35,36]</sup> So wurde zum Beispiel im Kontext von Exon19-Deletionen der Verlust von T790M zusammen mit dem Auftreten der Mutation G724S gefunden, welche innerhalb der Glycin-reichen Schleife (Exon18)

lokalisiert ist.<sup>[37]</sup> Die molekularen Mechanismen dieser Mutation sind noch im Detail zu klären, jedoch lässt sich vermuten, dass die Mutation eine verengte Bindetasche bewirkt, da die G-reiche Schleife bei der Bindung von ATP oder Liganden eine entscheidende Rolle spielt. In 22% der getesteten Fälle wurde die Mutation des Cysteins, welches als kovalenter Anker-Punkt für EGFR-Inhibitoren der zweiten und dritten Generation fungiert, beobachtet.<sup>[35,36]</sup> Durch den Austausch von Cystein zum weniger nukelophilen Serin (C797S) kann die Michael-Addition unter physiologischen Bedingungen nicht mehr stattfinden und vermittelt so klinische Resistenz gegen kovalente Wirkstoffe (Abbildung 3c).

Weitere onkogene Mutationen in EGFR betreffen den Beginn der Helix  $\alpha$ C in Exon20, wobei diverse Insertions-Mutationen gefunden wurden, die häufig in Duplikationen der bestehenden Aminosäure-Sequenz resultieren. D770\_N771insSVD, V769\_D770insASV und H773\_V774insNPH gehören zu den häufigsten Varianten.<sup>[10]</sup> Diese bewirken eine erhöhte katalytische Aktivität der Kinase, vermutlich durch Stabilisierung des aktiven Zustands der Helix C.<sup>[38]</sup> Analyse einer verfügbaren Kristallstruktur von EGFR-D770\_N771insNPG zeigt, dass die drei eingefügten Aminosäuren eine enge Schleife bilden, in welcher der Carbonyl-Sauerstoff von Asp770 und Amid-Stickstoff des eingefügten Glycins eine Wasserstoff-Brückenbindung ausbilden (Abbildung 4b). Dadurch blockiert Asp770 die Position, die im inaktiven Zustand des Wild-Typs von Arg776 besetzt wird, welches die Helix C durch H-Brücken mit Leu703 und Ala767 stabilisiert (Abbildung 4a und 4b). Interessanterweise wurde die Mutation D770delinsGY als Sensitiv gegenüber TKIs der zweiten Generation beschrieben, in welcher Arg770 durch ein räumlich wenig anspruchsvolles Glycin ersetzt ist.<sup>[39]</sup> Weiterhin zeigt die Kristallstruktur eine verengte Bindetasche, welche sterischen Konflikt mit der Bindung von Inhibitoren der dritten Generation aufweist. Dieser wird bedingt durch eine veränderte Konformation der Glycin-reichen Schleife und der angrenzenden Faltblätter  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 im Vergleich zur Struktur des EGFR-T790M, möglicherweise vergleichbar mit der G724S-induzierten Konformation.<sup>[38,40]</sup> Außerdem weist EGFR-D770\_N771insNPG eine mit dem Wild-Typ vergleichbare Affinität für ATP auf.<sup>[38]</sup> Bedingt durch diese Kombination, vermitteln Exon20-Mutationen vermutlich Resistenz gegenüber aktuell verfügbaren Inhibitoren.<sup>[41,42]</sup>

### 1.1.2. Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Her2)

Her2 unterscheidet sich teilweise von den verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie: Für Her2 ist kein endogener Ligand bekannt, der die extrazelluläre Domäne bindet und die Kinase-Domäne weist eine vergleichsweise geringe katalytische Aktivität auf, allerdings bildet der Rezeptor bevorzugt Hetero-Dimere mit den ErbB-Mitgliedern und verstärkt dadurch deren zelluläres Signal.<sup>[43,44]</sup>



**Abbildung 4.** **a)** Helix  $\alpha C$  des EGFR in der aktiven und inaktiven Konformation (grün/hellgrün bzw. rot/beige, PDB IDs: 1M17, 1XKK). **b)** Bedingt durch die EGFR-D770\_N771insNPG Insertions-Mutation verhindert Asp770 die Stabilisierung des inaktiven Zustands durch Arg776 (blau/cyan, PDB ID: 4LRM). **c)** Her2 weist eine GVG-Sequenz auf, wodurch die Helix nicht stabilisiert werden kann (gelb, PDB ID: 3PP0). Im Gegensatz dazu weist EGFR eine SVD-Sequenz auf (rot/beige, PDB ID: 1XKK). **d)** Chemische Strukturen des EGFR/Her2-Dualinhibitors Neratinib und des allosterischen EGFR-Inhibitors EAI045.

In NSCLC wurden Treiber-Mutationen des Her2 gefunden, welche in der strukturell analogen Position zu Exon20 Insertions-Mutationen in EGFR auftreten.<sup>[45,46]</sup> Die häufigste Variante ist Her2-A775\_G776insYVMA, gefolgt von G776delinsVC.<sup>[47]</sup> Man geht davon aus, dass eine Glycin-reiche Region am Anfang der Helix  $\alpha C$  die geringe Kinase-Aktivität bewirkt, welche eine hohe Flexibilität der Helix vermittelt, sodass der aktive Zustand weniger besetzt ist. Diese GVG-Sequenz ist einzigartig in Her2, während in EGFR, Her3 und Her4 eine SVD-Sequenz konserviert ist. Im



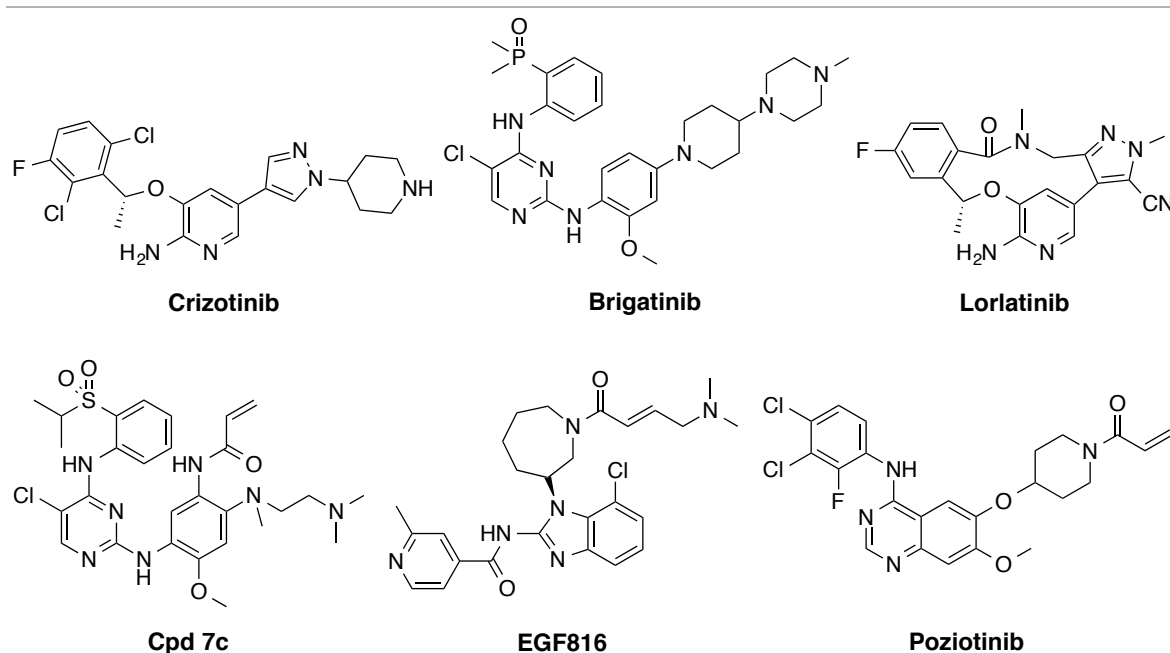
aktiven EGFR oder Her4 stabilisiert ein H-Brücken-Netzwerk diese Region, welches allerdings mit den Glycin-Aminosäuren nicht ausgebildet werden kann (Abbildung 4c). Es wird vermutet, dass Mutationen in diesem Bereich die Helix stabilisieren und dadurch die aktive Kinase-Konformation langlebiger wird.<sup>[48]</sup> Obwohl weitere strukturelle und biochemische Einblicke in die Mechanismen für ein tieferes Verständnis nötig sind, könnten diese Überlegungen durch die Mutation EGFR-D770delinsGY gestützt werden. Das durch die Mutation an analoger Position eingeführte Glycin könnte eine gewisse Flexibilität der Helix erlauben, so dass diese EGFR-Mutante Sensitivität gegenüber TKIs aufweist.<sup>[39]</sup>

Für die Behandlung von Patienten mit Läsionen des Her2 werden EGFR/Her2-Dualinhibitoren, wie Afatinib (Abbildung 1a) oder Neratinib<sup>[49-51]</sup> (Abbildung 4d) getestet.<sup>[52,53]</sup> Interessant ist dabei, dass Neratinib zu den Typ II TKIs gehört, welche eine hydrophobe Sub-Tasche binden, die nur in der inaktiven Konformation der Kinase zugänglich ist. Obwohl der inaktive Zustand in über-aktivierten Kinasen weniger häufig vorliegt, zeigen diese Wirkstoffe eine effektive Bindung an die Mutante.<sup>[20]</sup> Während für Afatinib erfolgreiche Fallstudien beschrieben wurden,<sup>[52]</sup> wurde für Neratinib kein Effekt in Patienten festgestellt.<sup>[53]</sup> Außerdem stellt Her2 ein attraktives *Target* dar, da ein aktives Her2-Signal Resistenz gegen EGFR-Inhibition als *bypass*-Mechanismus vermitteln kann (Abbildung 1).<sup>[24]</sup>

### 1.1.3. Anaplastische Lymphom-Kinase (ALK) und Mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor (MET)

Treiber-Mutationen in ALK sind hauptsächlich Gen-Fusionen, die in der Expression eines Fusionsproteins EML4-ALK (*Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) resultieren.<sup>[54,55]</sup> Dieses kann effizient durch den Wirkstoff Crizotinib<sup>[56,57]</sup> (Abbildung 5) inhibiert werden,<sup>[58,59]</sup> jedoch wurde eine Vielzahl von Resistenzmutationen in ALK identifiziert.<sup>[60-67]</sup> An der Stelle ist interessant, dass sich die Mutationen an *Hot-Spots* in den homologen Proteinkinasen häufen und sich so Erkenntnisse zwischen den *Targets* übertragen lassen.<sup>[6]</sup> So tritt bei ALK ebenfalls eine Mutation der Türsteher-Aminosäure auf, bei der eine Methionin-Seitenkette eingebaut wird (L1196M).<sup>[60]</sup> Hier scheint sterische Abstoßung eine gewisse Rolle zu spielen, jedoch verliert Crizotinib darüber hinaus für die Bindung wichtige hydrophobe Kontakte mit der Leucin-Seitenkette.<sup>[68]</sup> Neben den identifizierten Resistenzen, führte die schlechte Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch Crizotinib<sup>[69]</sup> zur Entstehung von Hirn-Metastasen,<sup>[70-72]</sup> und resultierte in der Entwicklung von neuen Inhibitoren, wie z.B. Brigatinib<sup>[73-75]</sup> und Lorlatinib<sup>[76,77]</sup> (Abbildung 5), welche teilweise den Pyrimidin-basierten EGFR-T790M Inhibitoren der dritten Generation strukturell ähneln.

Überexpression der RTK MET (Mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor) bewirkt eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren, da das zelluläre Signal über diesen Rezeptor umgeleitet werden kann (Abbildung 1).<sup>[24,78]</sup> Der ALK Inhibitor Crizotinib weist hohe Aktivität gegenüber MET und ROS1 auf,<sup>[56,57]</sup> jedoch sind die klinischen Ergebnisse bisher wenig vielversprechend und die Validität der immunohistochemischen Methoden zum Nachweis des Biomarkers werden derzeit in Frage gestellt.<sup>[79]</sup> Positive Ergebnisse wurden jedoch in Exon14 mutiertem MET erzielt,<sup>[80]</sup> sodass hier weitere Grundlagenforschung an den Biomarkern nötige Erkenntnisse für eine erfolgreiche Therapie liefern kann.



**Abbildung 5.** Repräsentative chemische Strukturen von ALK TKIs Crizotinib, Brigatinib und Lorlatinib, sowie des EGFR/ALK-Dualinhibitors Cpd 7c. Bei EGF816 und Poziotinib handelt es sich um Wirkstoff-Kandidaten gegenüber Exon20-mutiertem EGFR.

## 1.2. Neue Ansätze zur Behandlung von NSCLC: Immuntherapie

Patienten, die keine Mutationen in den oben beschriebenen Zielproteinen aufweisen, oder die nicht auf die Therapie mit TKIs ansprechen, können derzeit nur mit Chemotherapie behandelt werden. Inhibitoren von Immun-Kontrollpunkten stellen jedoch eine alternative Behandlungs-Methode für diese Patientengruppe dar. Tumor-Zellen entgehen der Immun-Antwort des Wirt-Immunsystems durch Überexpression des *programmed death ligand 1* (PD-L1), welcher von T-Lymphozyten gebunden wird, die einen PD-1 Rezeptor anbieten. Dadurch wird die Reaktion des Immunsystems unterdrückt, welche durch Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Interaktion wiederhergestellt werden kann.<sup>[81-83]</sup> Dazu werden monoklonale Antikörper eingesetzt (Pembrolizumab<sup>[84]</sup>, Nivolumab<sup>[85]</sup> und Atezolizumab<sup>[86]</sup>;



Tabelle 1) welche derzeit vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien zeigen.<sup>[81-83]</sup> Auch wenn noch nicht abschließend geklärt ist, ob die immunohistochemische Bestimmung der PD-L1-Expression als prädiktiver Biomarker verwendet werden kann,<sup>[87,88]</sup> wird diese Therapie die Behandlung von NSCLC revolutionieren.

**Tabelle 1.** Antikörper zur Inhibition der PD-1/PD-L1-Interaktion in klinischer Entwicklung.

Antigen	Antikörper	Handelsname	Hersteller
PD-1	Pembrolizumab	Keytruda	Merck Sharp & Dohme
	Nivolumab	Opdivo	Medarex/Bristol-Myers Squibb
PD-L1	Atezolizumab	Tecentriq	Genentech/Roche
	Durvalumab	Imfinzi	Medimmune/AstraZeneca
	Avelumab	Bavencio	Merck KGaA und Pfizer

### 1.3. Investigative und neue Inhibitoren von mutiertem EGFR

Zur Inhibition von mutiertem EGFR-L858R/T790M/C797S wurde kürzlich ein allosterischer Typ III Inhibitor EAI045<sup>[89]</sup> vorgestellt (Abbildung 4d). Diese binden die hydrophobe Subtasche, die auch Typ II Inhibitoren, wie Neratinib, binden, jedoch besetzen sie nicht die ATP-Bindetasche und konkurrieren daher auch nicht mit dem Co-Faktor. Erwartungsgemäß eignen sie sich nicht zur Inhibition von EGFR mit Exon19 Deletions-Mutationen,<sup>[89]</sup> da in dieser die hydrophobe Subtasche nicht zugänglich ist.<sup>[12]</sup> Klinisch tritt die aktivierende deletions-Mutation jedoch häufiger im Kontext mit T790M/C797S auf.<sup>[35]</sup> Außerdem konnte auf zellulärer Ebene und *in vivo* nur in Kombination mit einem Antikörper effektive Inhibition durch diese Wirkstoffe gezeigt werden, da dieser der Dimerisierung der Rezeptoren entgegenwirkt.<sup>[89]</sup> Diese Verbindungs-Klasse bindet, wie am Beispiel von Neratinib diskutiert (Abschnitt 1.1.2), die inaktive Kinase-Konformation, welche jedoch in EGFR mit aktivierenden Mutationen weniger häufig vorliegt. Im Gegensatz zu Typ II Inhibitoren, können diese Wirkstoffe vermutlich die inaktive Konformation weniger gut stabilisieren und sind darauf angewiesen, dass keine durch die Dimerisierung der Rezeptoren induzierte Aktivierung der Kinase-Domänen stattfindet.

In einer weiteren Studie wurden ALK-Inhibitoren im Kontext von multi-Wirkstoff-resistentem EGFR getestet.<sup>[90]</sup> Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.3), weisen ALK-Inhibitoren der zweiten und dritten Generation teilweise eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu EGFR-Inhibitoren der dritten Generation auf und wurden

ebenfalls entwickelt, um eine Kinase mit Methionin-Türsteher zu binden. Brigatinib wurde dabei als besonders potent im Kontext von EGFR-delE746\_A750/T790M/C797S gefunden, jedoch musste auch hier für *in vivo* Aktivität eine Kombination mit EGFR-Antikörpern verwendet werden.<sup>[90]</sup> Dennoch inspirierten diese Erkenntnisse weitere Ansätze und so wurden mehrere EGFR/ALK-Dualinhibitoren vorgestellt (z.B. Cpd 7c, Abbildung 5), deren Testung im Kontext von C797S jedoch bisher nicht intensiv durchgeführt oder beschrieben wurde.<sup>[91,92]</sup>

Als wirksam gegen Exon20-mutierten EGFR wurde Nazartinib/EGF816<sup>[93,94]</sup> (Abbildung 5) vorgestellt. Allerdings wurde hier lediglich eine Abnahme des Tumor-Volumens *in vivo* nachgewiesen, es erfolgte keine Charakterisierung in biochemischen oder zellulären Testsystemen.<sup>[94]</sup> Außerdem scheint es, als wäre die Entwicklung des Wirkstoffs als Inhibitor von Exon20-mutierten Tumoren mittlerweile eingestellt worden. Detailliertere Daten wurden für AP32788 gezeigt und eine potente Inhibition mehrerer verschiedener Exon20 Mutations-Varianten des EGFR nachgewiesen.<sup>[95]</sup> Aktuell wird der Wirkstoff in klinischen Phase I/II-Studien getestet, wobei auch die Testung an Patienten mit Läsionen in EGFR Exon20 vorgesehen ist.<sup>[96]</sup> Es ist jedoch bisher keine Strukturformel des kovalenten Inhibitors veröffentlicht worden. Vorläufige klinische Daten der Phase II liegen für Poziotinib<sup>[97]</sup> (Abbildung 5) vor. Dabei zeigten 73% der Patienten mit Exon20 Mutationen partielles Ansprechen auf den kovalenten Anilino-Chinazolin-basierten Inhibitor.<sup>[98]</sup>

## 2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von Wirkstoffen der mutierten Varianten der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Lungenkrebs und eignen sich als Zielproteine für die Behandlung mit niedermolekularen Wirkstoffen als alternativen Behandlungsansatz zur Chemotherapie. Dabei stand Wirkstoff-resistenter EGFR mit aktivierender Mutation (L858R oder delE746\_A750) und Türsteher-Mutation (T790M), sowie Mutation des Anker-Punktes für kovalente Inhibitoren (C797S) im Fokus. Weiterhin wurden Studien an Exon20-Mutanten des Her2 (G776delinsVC und A775\_G776insYVMA) und EGFR (D770\_N771insSVD) durchgeführt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Wirkstoffen sind verlässliche Testsysteme zur Charakterisierung und Bewertung der investigativen Inhibitoren. Biochemische Assays liefern dabei wichtige Informationen über den direkten Effekt auf die isolierte Kinase-Domäne und sind im Arbeitskreis für die oben genannten mutierten Varianten verfügbar. Zelluläre Viabilitäts-Assays tragen weitere Informationen bei, wie z.B. die Membran-Permeabilität. Diese Assay-Systeme, sowie die nötige Zellkultur sind im Arbeitskreis nicht verfügbar und sollten im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden. Dabei sollen diese Viabilitäts-Assays auf Krebszellen mit den oben genannten Mutationen, sowie mehrere Wild-Typ Zelllinien als Zytotoxizitäts-Kontrolle angewendet werden. Die Herausforderungen sind dabei (i) die Handhabung mehrerer verschiedener Zelllinien parallel, (ii) die Validierung des jeweiligen Assays mit Literatur-beschriebenen Referenzverbindungen, wodurch die Vergleichbarkeit der Daten im Kooperations-Konsortium sichergestellt werden soll, sowie anschließend (iii) die Durchführung des Assays in hohem Durchsatz mit entsprechender Verarbeitung und Evaluierung der erhaltenen Aktivitätsdaten. Schlussendlich erlaubt die Kombination der zellulären und biochemischen Daten eine detaillierte Bewertung der inhibitorischen Potenz und Selektivität der getesteten Wirkstoffe, sowie Einblicke in deren Struktur–Aktivitäts-Beziehung.

Die drei entscheidenden Faktoren für die Entwicklung von Inhibitoren des EGFR-T790M (Verwendung neuer Grundgerüste, Selektivität gegenüber Wild-Typ und kovalente Alkylierung von Cys797) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf das Inhibitor-Design angewendet. Die Verwendung des 7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Gerüst als etablierte EGFR-TKI Grundstruktur<sup>[99,100]</sup> und die Einbringung eines Acrylamids als Elektrophil zur kovalenten Modifikation der Kinase lieferte selektive Inhibitoren des EGFR-L858R/T790M, wie Vorversuche zeigten.<sup>[101]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Wirkstoffe weiterentwickelt werden, um neue, selektive und potente Inhibitoren zu erhalten. Studien mit diesen und weiteren Liganden sollten anschließend an C797S-mutiertem EGFR durchgeführt werden.

Um Inhibitoren von mutierten Varianten des Her2 entwickeln zu können, sollten etwa 1700 Kinase-fokussierte Verbindungen in einer biochemischen Substanz-Durchmusterung getestet werden. Wichtige Struktur motive sollten identifiziert und mit dem kovalenten Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst kombiniert werden. Die so erhaltenen Inhibitoren, sowie weitere Wirkstoffe sollten im Kontext von Her2 und EGFR Exon20-Mutationen getestet werden, um weitere Einblicke in die Bindungseigenschaften verschiedener Liganden zu gewinnen.

### 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1. Etablierung zellulärer Testsysteme zur Bewertung von Inhibitoren der ErbB-Familie

Die Bestimmung der Zell-Viabilität und deren Beeinträchtigung durch investigative Inhibitoren liefert wichtige Informationen und beinhaltet Effekte, wie die Membran-Permeabilität und bildet die Wechselwirkung der Verbindung mit dem gesamten Rezeptor inklusive seiner Eigenschaften zur Bildung von homo- und hetero-Dimeren, Membran-Lokalisierung, sowie dessen Interaktion mit dem komplexen Netzwerk aus zellulären Signalkaskaden, etc. ab. Die Testung von Wild-Typ Zelllinien ermöglicht weiterhin, die Identifizierung von zytotoxischen Verbindungen oder solchen mit hohen *off-Target*-Effekten. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit der kommerzielle CellTiter-Glo Assay von Promega für elf verschiedene Zelllinien etabliert (Tabelle 2).<sup>‡</sup> Dieser Viabilitäts-Assay basiert auf der Quantifizierung des Gehalts an Adenosintriphosphat, welcher proportional zur Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist. Nach Zell-Lyse freigesetztes ATP wechselwirkt dabei mit einem Luciferase-gekoppelten Reporter, wodurch Luciferin zu lumineszентem Oxyluciferin umgesetzt wird, welches dann detektiert werden kann. Durch Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor in einer seriellen Verdünnungsreihe kann ein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden, wobei DMSO- und 10 µM Staurosporin-behandelte Zellen als Kontrolle verwendet wurden. Staurosporin ist ein multi-Kinase-Inhibitor, welcher dadurch als Zytostatikum wirkt.<sup>[103,104]</sup>

Die hier verwendeten Zelllinien weisen die zu untersuchenden Mutationen des EGFR bzw. Her2 auf. Es wurden weiterhin die Wild-Typ Zelllinie A431<sup>[105]</sup> aus einem Plattenepithel-Karzinom verwendet, welche jedoch durch Überexpression des EGFRs eine gewisse Abhängigkeit von dessen Signal aufweist.<sup>[106]</sup> Außerdem wurden zwei kRas-mutierte Lungenkrebs-Zelllinien H358<sup>[107]</sup> und A549<sup>[105,108]</sup> getestet. Diese weisen das mutierte Onkogen in der Signalkaskade dem EGFR nachgeschaltet auf, sind daher teilweise Unabhängig von EGFR-Inhibition (Abbildung 1) und lassen so Rückschlüsse auf mögliche Zytotoxizität der Verbindung zu. Die Zelllinie SCCNC4<sup>[109,110]</sup> wurde aus einem Tumor des Nasenrachenkrebs isoliert und weist einen Exon20-mutierten EGFR auf, jedoch ist nicht geklärt ob sie von einem EGFR-Signal abhängig ist und ob mit dessen Inhibition ein Effekt erzielt werden kann. Die PC9<sup>[111]</sup> Zelllinie weist eine Exon19-Deletion auf und wurde auch in zwei genomisch mutierten Varianten getestet,

---

<sup>‡</sup> Etablierung des Assays für die Zelllinien HCC827, H358, A549 & H1781 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>, sowie für die Zelllinien SCCNC4 & Ba/F3(ΔinsYVMA) durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup> und J. Lategahn, sowie für die Zelllinien PC9, PC9(T790M), PC9(T790M/C797S) durch: H.L. Tumbrink (AG D. Rauh, TU Dortmund)

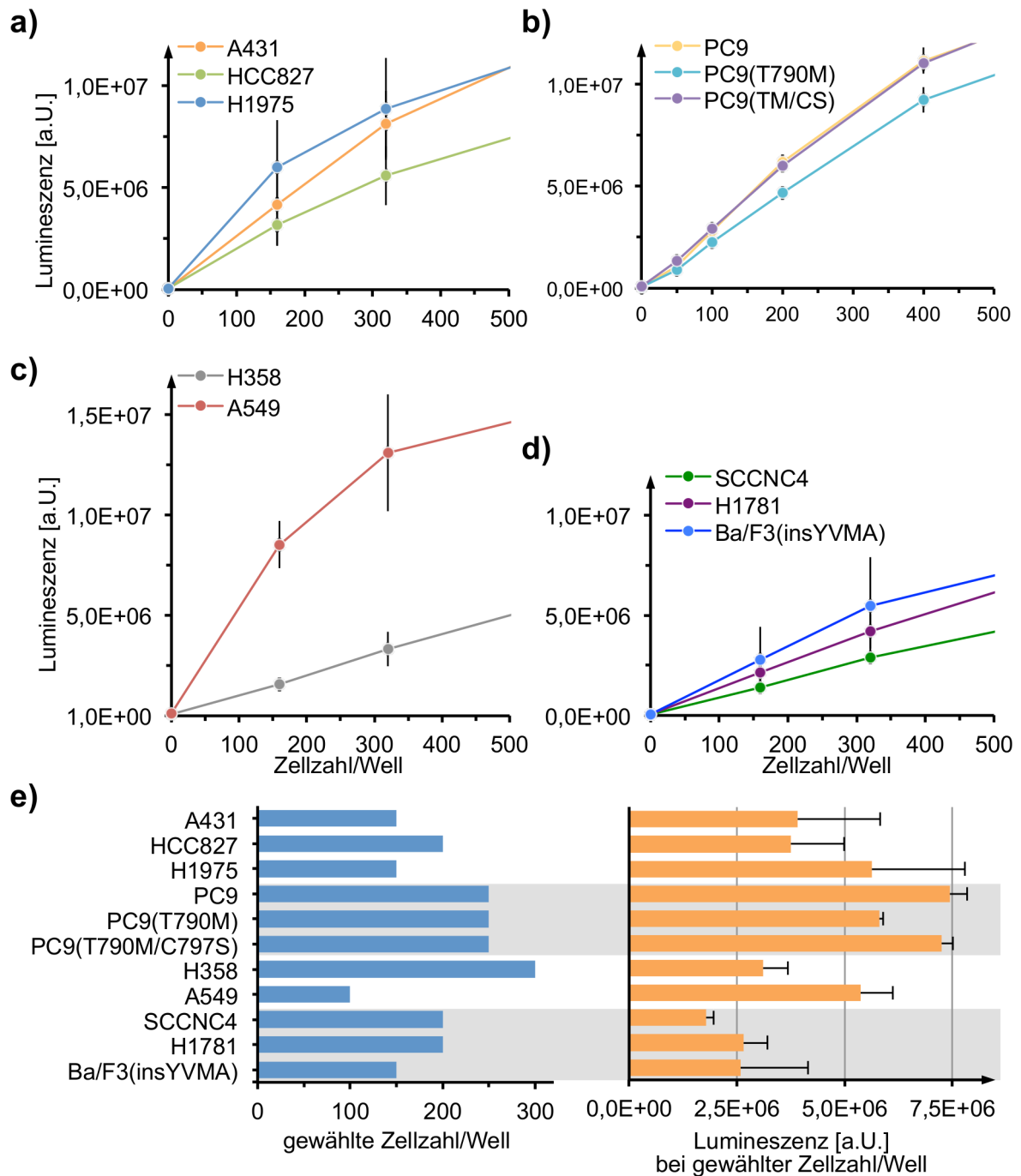
wobei durch die CRISPR/Cas9-Methode die Mutation T790M bzw. T790M/C797S eingeführt wurde, um so ein zelluläres Testsystem für Cys797-mutierten EGFR zu erhalten. Die Her2 Exon20-Insertionsmutante wurden in murine, blutbildende Ba/F3-Zellen transfiziert, welche durch die Abhängigkeit von dem mutierten Onkogen in Abwesenheit von Interleukin-3 wachsen können.<sup>-, [112]</sup> Zusammen mit den Patienten-abgeleiteten Lungenkrebs-Zelllinien HCC827,<sup>[113]</sup> H1975<sup>[19]</sup> und H1781<sup>[45,114]</sup> wurde so ein Set von elf Zelllinien etabliert und zur Charakterisierung von Inhibitoren herangezogen (Tabelle 1).

**Tabelle 2.** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien mit den jeweiligen Läsionen.

Zelllinie	Charakteristik	Literaturverweis
A431	EGFR-WT, EGFR Amp./Überexpression	[105,106]
HCC827	EGFR-delE746_A750	[113]
H1975	EGFR-L858R/T790M	[19]
PC9	EGFR-delE746_A750	[111]
PC9(T790M)	EGFR-delE746_A750/T790M	[115]
PC9(T790M/C797S)	EGFR-delE746_A750/T790M/C797S	-
H358	kRas-G12C	[107]
A549	kRas-G12S, EGFR/Her2 Amp.	[105,108]
SCCNC4	EGFR-D770_N771insSVD	[109,110]
H1781	Her2-G776delinsVC	[45,114]
Ba/F3(insYVMA)	Her2-A775_G776insYVMA	[112]

Eine Voraussetzung für die Verwendung des CellTiter-Glo Assays ist die Ermittlung der Zellzahl pro Well in den verwendeten 384er-Platten, welche innerhalb des linearen Bereichs des Assays liegen muss um verlässliche Daten zu liefern. Es wurde daher eine Titration der Zellen vorgenommen und gegen das erhaltene Lumineszenz-Signal aufgetragen (Abbildung 6a–d und Anhang, Abbildung A1). Es wurden entsprechend Zellzahlen ermittelt, welche das unterschiedliche Wachstumsverhalten kompensieren und etwa vergleichbare Signalintensitäten innerhalb der vier Gruppen an Zelllinien eingestellt (Abbildung 6e).

<sup>-</sup> Generierung der Zelllinien PC9(T790M), PC9(T790M/C797S) & Ba/F3(insYVMA) durch: D. Plenker (AG M. Sos, Universitätsklinikum Köln)



**Abbildung 6.** Ermittlung der zu verwendenden Zellzahl pro Well für die elf hier getesteten Zelllinien. **a–d)** Titration der Zellzahl und Auftragung gegen das erhaltene lumineszente Signal. **e)** Übersicht über die gewählten Zellzahlen und Auftragung der zugehörigen Lumineszenz-Signalintensität. Diese wurde möglichst vergleichbar innerhalb der Gruppe an Zelllinien eingestellt.

Anschließend wurden Literatur-beschriebene Referenzverbindungen bei drei verschiedenen Zellzahlen getestet, um die gewählte Zellzahl zu bestätigen. Es wurde generell eine Unabhängigkeit von der Zellzahl innerhalb des linearen Assay-Bereichs festgestellt,<sup>[102]</sup> lediglich die SCCNC4 Zellen zeigten zunehmende EC<sub>50</sub>-Werte mit steigender Zellzahl (Anhang, Tabelle A1), was unterstreicht dass die Eigenschaften dieser Zelllinie noch aufzuklären sind. Eine mögliche Erklärung

wäre an der Stelle eine heterogene Population an Zellen mit teilweise unterschiedlichem genetischen Hintergrund oder unterschiedlichen Treiber-Onkogenen.

Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte bei der gewählten Zellzahl sind für eine Reihe von Referenz-Verbindungen in Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei zeigen reversible Inhibitoren der ersten Generation, Erlotinib,<sup>[116]</sup> Gefitinib und AEE788,<sup>[100,117]</sup> erwartungsgemäß moderate inhibitorische Potenz gegenüber A431 Zellen mit EC<sub>50</sub>-Werten zwischen 1,7 und 2,1 µM und eine hohe nanomolare Aktivität gegenüber HCC827 Zellen, welche einen EGFR mit aktivierungs-Mutation aufweisen. Sie zeigen nur einen schwachen Effekt gegenüber T790M-mutierten H1975 Zellen. Afatinib zeigt als kovalenter Inhibitor der zweiten Generation ähnliche Potenz gegenüber A431 Wild-Typ Zellen und Türisteher-mutierten H1975 Zellen. Hohe Potenz wurde gegenüber HCC827 Zellen gefunden und als panHer-Inhibitoren weisen die Struktur-verwandten Wirkstoffe Afatinib und Canertinib<sup>[118]</sup> ebenfalls Potenz gegenüber Her2-abhängigen Zelllinien auf. Neratinib weist den zu erwartenden Verlust an Aktivität gegenüber H1975 auf, da der Methionin-Türisteher nicht kompatibel mit den sterisch anspruchsvollen, hydrophoben Anilin-Substituenten der Typ II-TKIs ist. Diese sind jedoch vorteilhaft bei der potenten Inhibition von Exon20-mutiertem Her2 bzw. EGFR und dementsprechend hohe Aktivität wurde gegenüber den korrespondierenden Zelllinien festgestellt. Lapatinib<sup>[119]</sup> weist als reversibler panHer-Inhibitor allgemein moderate inhibitorische Potenz auf. Wild-Typ-selektive dritt-Generations-Inhibitoren des EGFR-T790M, Osimertinib, Rociletinib,<sup>[120]</sup> WZ4002<sup>[121,122]</sup> und EGF816, zeigen dementsprechend nanomolare EC<sub>50</sub>-Werte gegenüber H1975 Zellen.

**Tabelle 3.** Zelluläre Evaluation von Referenz-Verbindungen zur Assay-Validierung.

Cpd	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR/Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	A431 HCC827 H1975	PC9 PC9(T790M) PC9(TM/CS)	H358 A549	SCCNC4 H1781 Ba/F3(insYVMA)
<b>Erlotinib</b>	2100 ± 980	n.b.	n.b.	7200 ± 2500
	28 ± 4			5700 ± 2400
	7400 ± 1400			168 ± 58
<b>Gefitinib</b>	1700 ± 790	165 ± 117	11000 ± 4900 19000 ± 12000	7200 ± 420
	<14	6700 ± 2300		3400 ± 860
	11000 ± 2600	7300 ± 2800		631 ± 412
<b>AEE788</b>	1800 ± 1100	n.b.	3800 ± 380 4000 ± 720	1600 ± 410
	16 ± 3			2000 ± 880
	4700 ± 1000			1500 ± 550



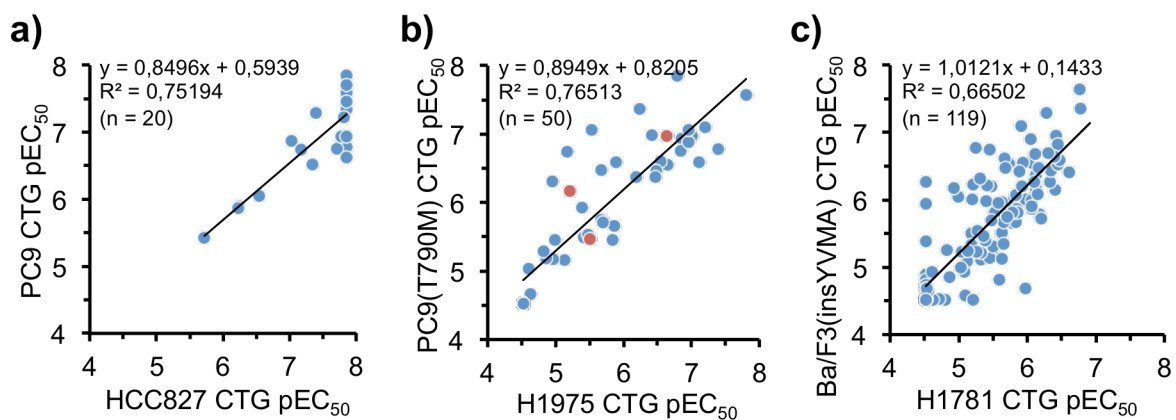
Cpd	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR/Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	A431 HCC827 H1975	PC9 PC9(T790M) PC9(TM/CS)	H358 A549	SCCNC4 H1781 Ba/F3(insYVMA)
<b>Afatinib</b>	634 ± 312 <14 653 ± 109	<14 604 ± 362 4400 ± 540	1300 ± 520 1500 ± 430	820 ± 505 174 ± 83 <14
<b>Caner- tinib</b>	n.b.	n.b.	3800 ± 4 8600 ± 1100	4600 ± 2300 533 ± 32 51 ± 39
<b>Nera- tinib</b>	630 ± 801 58 ± 14 2700 ± 2600	n.b.	282 ± 67 496 ± 216	422 ± 207 122 ± 45 9 ± 4
<b>Lapa- tinib</b>	2300 ± 970 1400 ± 1100 9100 ± 4500	n.b.	9900 ± 3100 18000 ± 9400	15000 ± 8600 3000 ± 1300 1500 ± 1300
<b>Osimer- tinib</b>	756 ± 340 <14 16 ± 5	32 ± 25 <14 2700 ± 490	2800 ± 360 1800 ± 260	1300 ± 950 461 ± 222 365 ± 329
<b>Rocile- tinib</b>	1900 ± 470 45 ± 11 145 ± 86	301 <sup>a</sup> 174 ± 106 4700 ± 2600	n.b.	2300 ± 150 1500 ± 480 837 ± 428
<b>WZ4002</b>	2100 ± 440 20 ± 6 97 ± 37	176 ± 107 48 ± 9 3400 ± 550	4400 ± 510 4000 ± 550	2500 ± 310 1900 ± 870 291 ± 230
<b>EGF816</b>	4400 ± 1400 <14 328 ± 161	241 ± 160 348 ± 190 6900 ± 900	n.b.	3800 ± 1900 2200 ± 460 244 ± 122

<sup>a</sup>Einfachbestimmung, n.b. = nicht bestimmt

Im Weiteren wurden die Daten der vergleichbaren Zelllinien ins Verhältnis gesetzt. Dabei weisen sowohl die PC9, als auch die HCC827 eine EGFR-delE746\_A750 auf. 20 Inhibitoren wurden in beiden Zelllinien getestet und konnten für einen direkten Vergleich herangezogen werden (Abbildung 7a). Es zeigte sich, dass neun der getesteten Verbindungen die Auflösungsgrenze des HCC827-Assays erreichten, während die Aktivität dieser Verbindungen im Assay der PC9 Zellen noch differenziert dargestellt wird. Die Zelllinie HCC827 ist also sensitiver gegenüber EGFR-TKIs. Es wird jedoch eine gute Korrelation für mäßig aktive Verbindungen (HCC827 pEC<sub>50</sub> zwischen 5 und 7,5) festgestellt. Weiterhin wurden die genetisch veränderten PC9(T790M) Zellen, welche eine EGFR-delE746\_A750/T790M Mutation aufweisen, mit L858R/T790M-mutierten H1975 Zellen verglichen (Abbildung 7b). Dabei konnte eine gute Korrelation an 50 getesteten Verbindungen nachgewiesen werden, da die Regressionsgerade der bestimmten Aktivitäten mit einer Steigung von 0,89 nahe der Idealen ( $m = 1$ ) liegt.

Der Achsenabschnitt von 0,82 ist dabei leicht verschoben und indiziert erhöhte Werte in der mutierten PC9(T790M) Zelllinie. Außerdem wird deutlich, dass für die getesteten Verbindungen die Art der aktivierenden Mutation keinen ausgeprägten Einfluss auf die Bindung der Inhibitoren bewirkt. Dabei wurden allerdings lediglich drei Typ II Inhibitoren getestet (rot markiert), welche mit der Exon19 Deletions-Mutation weniger gut kompatibel sind.<sup>[12]</sup> Die beiden Zelllinien H1781 und Ba/F3(insYVMA) wurden für die Charakterisierung der Her2-gerichteten Inhibitoren verwendet, wobei die Patienten-abgeleitete H1781 eine Her2-G776delinsVC aufweist und die A775\_G776insYVMA im artifiziellen Ba/F3-System exprimiert wurde. Die Korrelation beider Datensätze (n = 119 Verbindungen) zeigt eine gute Übereinstimmung (m = 1,01 und b = 0,14), jedoch eine hohe Streuung der Aktivitätsdaten mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,66 (Abbildung 7c). Es bietet sich also an, die Aktivitäts-Daten beider Zelllinien in die Bewertung der Inhibitoren einfließen zu lassen.

Zusammenfassend konnte hier ein Zell-Viabilitäts-Assay für elf Zelllinien etabliert werden, der die Charakteristika von Literatur-bekannten klinischen Inhibitoren zuverlässig abbilden und auflösen kann und für vergleichbare Zelllinien ähnliche EC<sub>50</sub>-Werte liefert.



**Abbildung 7.** Korrelation der Daten aus vergleichbaren Zelllinien. **a)** Vergleich der beiden EGFR-delE746\_A750-mutierten Zelllinien PC9 und HCC827. **b)** Vergleich der beiden EGFR-T790M-mutierten Zelllinien PC9(T790M) und H1975, wobei sich diese in ihrer Aktivierungsmutation unterscheiden (EGFR-delE746\_A750 vs. L858R). Typ II Inhibitoren sind rot markiert. **c)** Vergleich der beiden Her2-mutierten Zelllinien Ba/F3(insYVMA) und H1781.

## 3.2. Entwicklung von Inhibitoren zur Umgehung von Wirkstoff-Resistenzen in EGFR

### 3.2.1. Einblicke in die Anforderungen an viert-Generations TKIs

Die etablierten zellulären Testsysteme wurden auf eine Serie von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren angewendet. Auf diesem Grundgerüst basiert der kovalenten Inhibitor Ibrutinib<sup>[123,124]</sup> (Abbildung 9a) der Bruton's Tyrosin-Kinase (BTK) und zeigt eine gewisse inhibitorische Potenz gegenüber EGFR. Dieses inspirierte Engel und Smith, *et al.*,<sup>[125]</sup> verschiedene Substituenten in C3-Position einzuführen und einen potenten Inhibitor des Wirkstoff-resistenten EGFR-L858R/T790M zu entwickeln.\*

Die Verbindungen wurden in einem biochemischen HTRF Assay getestet,<sup>†</sup> welcher die katalytische Aktivität der isolierten Kinase-Domäne quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass das unsubstituierte Gerüst (**1a**) bzw. kleine Substituenten, wie Iod (**1b**), Alkin (**1c**) oder Cyclopropyl (**1d**) eine selektive Inhibition der katalytischen Aktivität der mutierten Kinase-Domäne bewirken. Besonders potent war dabei **1b** mit C3-Iod-Substituenten und zeigte biochemische IC<sub>50</sub>-Werte von 284 nM gegenüber EGFR-WT und 18 nM gegenüber doppelt mutiertem EGFR (Tabelle 4). Die Zelluläre Charakterisierung<sup>‡</sup> zeigte jedoch Optimierungsbedarf im Bezug auf die Potenz gegenüber Lungenkrebs-Zelllinien. Verbindung **1b** zeigte dabei einen halb-maximalen Effekt gegenüber EGFR-L858R/T790M mutierten H1975 Zellen von knapp 4 µM. Die Einführung eines Phenyl-Substituenten, bzw. von verschieden dekorierten Phenyl-Substituenten (**1e–1j**) bewirkte einen Verlust der Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR. Für Verbindung **1e** wurden biochemische IC<sub>50</sub>-Werte von 136 und 243 nM gegenüber Wild-Typ bzw. mutierter Variante bestimmt. Verbindung **1i** mit *para*-CF<sub>3</sub>-dekoriertem Phenyl-Substituenten zeigte aus dieser Reihe mit 1,4 µM die höchste Potenz in H1975 Zellen. Die Benzyl-substituierte Verbindung **1k** zeigte jedoch deutliche Selektivität über Wild-Typ und potente Inhibition der Türsteher-mutierten Kinase (IC<sub>50</sub> = 21 bzw. 10 nM), sowie zelluläre Aktivität von knapp 700 nM in H1975 Zellen. Im Weiteren wurden daraufhin die bityklich substituierten Verbindungen **1l–1q** getestet. Von diesen zeigten die Verbindungen **1l–1o** potente Inhibition der Kinase-Aktivität von EGFR-L858R/T790M im niedrig-nanomolaren Bereich (IC<sub>50</sub> zwischen 0,6 und 2,7 nM),

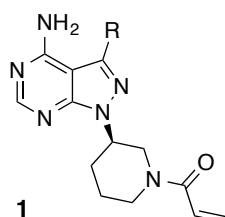
\* Synthese der Verbindungen durch: J. Engel & S. Smith im Rahmen ihrer Dissertationen,<sup>[126,127]</sup> sowie L. Goebel & E. Hennes im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeiten<sup>[128,129]</sup>

† Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

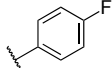
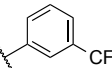
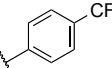
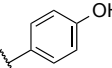
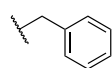
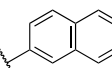
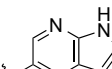
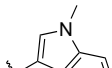
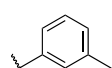
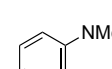
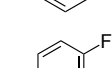
‡ Zelluläre Charakterisierung der Zelllinien HCC827, H358 & A549 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

während Dekorationen der 4-Position von 1-Naphtyl-substituierten Verbindungen **1p–1q** nicht toleriert sind. Verbindung **1l** sticht durch sub-nanomolare biochemische Inhibition ( $IC_{50} = 0,6 \text{ nM}$ ) und den intensivsten Effekt auf Krebszellen (H1975  $EC_{50} = 140 \text{ nM}$ ) heraus. HCC827 Zellen, welche eine Exon19-Deletion als aktivierende Mutation tragen, zeigten einen  $EC_{50}$  von unter  $14 \text{ nM}$  und Selektivität über Wild-Typ verdeutlicht der hohe  $EC_{50}$  von  $3,6 \mu\text{M}$  in A431 Zellen. Verbindung **1n** fällt ebenfalls als sehr potent auf, mit einem zellulären halb-maximalen Effekt bei  $205 \text{ nM}$  und einer deutlichen Selektivität (A431  $EC_{50} = 8,9 \mu\text{M}$ ). Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass für die Verbindungen dieser Serie allgemein ein sehr geringer Effekt auf die kRas-mutierten Zelllinien H358 und A549 gefunden wurde. Diese sind teilweise von EGFR unabhängig und können daher einen Hinweis auf zytotoxische Verbindungen geben (siehe Abschnitt 3.1).

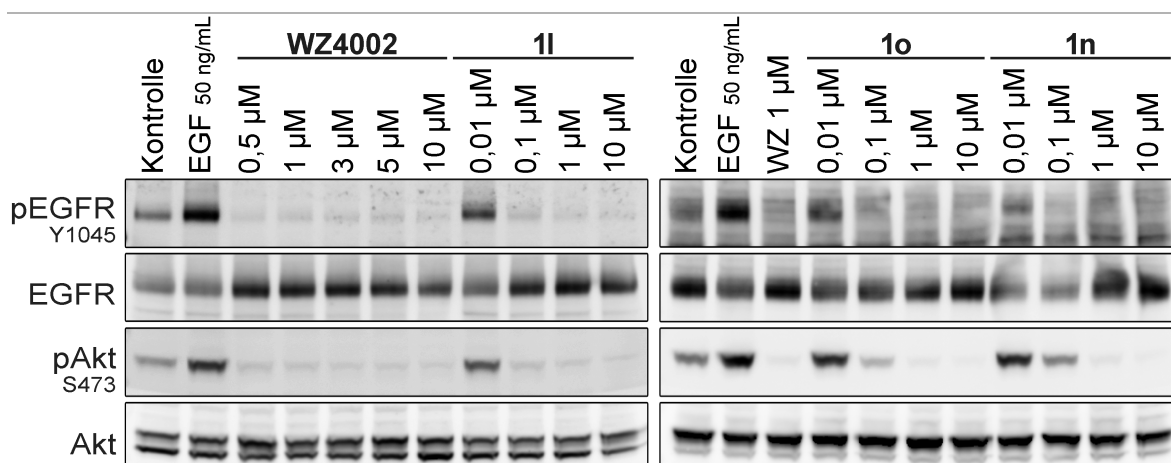
**Tabelle 4.** Biochemische und zelluläre Evaluation von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit unterschiedlichen Substitutionen der C3-Position.



Cpd	R	EGFR HTRF $IC_{50} [\text{nM}]$	EGFR CTG $EC_{50} [\text{nM}]$	kRas CTG $EC_{50} [\text{nM}]$
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>1a</b>		$6900 \pm 900$ $2500 \pm 170$ $1600 \pm 490$	$>30000$ $9900 \pm 1000$ $>30000$	$>30000$ $>30000$
<b>1b</b>		$284 \pm 98$ $17 \pm 5$ $18 \pm 3$	$18000 \pm 7100$ $588 \pm 134$ $3900 \pm 940$	$16000 \pm 7200$ $23000 \pm 7300$
<b>1c</b>		$1500 \pm 660$ $958 \pm 136$ $693 \pm 336$	$30000 \pm 690$ $2100 \pm 380$ $16000 \pm 2900$	$28000 \pm 3500$ $28000 \pm 3000$
<b>1d</b>		$668 \pm 84$ $107 \pm 43$ $226 \pm 81$	$28000 \pm 4100$ $313 \pm 117$ $5800 \pm 1800$	$>30000$ $>30000$
<b>1e</b>		$136 \pm 58$ $11 \pm 3$ $243 \pm 43$	$13000 \pm 4400$ $71 \pm 21$ $3700 \pm 1000$	$20000 \pm 7400$ $21000 \pm 7400$
<b>1f</b>		$128 \pm 67$ $12 \pm 3$ $234 \pm 54$	$12000 \pm 3800$ $73 \pm 25$ $3400 \pm 850$	$23000 \pm 6600$ $>30000$

Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
1g		131 ± 30 26 ± 8 281 ± 96	17000 ± 5900 81 ± 34 1800 ± 360	>30000 28000 ± 4200
1h		366 ± 91 27 ± 2 223 ± 76	16000 ± 2800 653 ± 129 4200 ± 770	18000 ± 4600 22000 ± 3800
1i		62 ± 15 63 ± 32 268 ± 21	8900 ± 4400 157 ± 76 1400 ± 310	12000 ± 2600 >30000
1j		28 ± 18 2,8 ± 1,6 43 ± 37	4200 ± 2200 73 ± 18 1800 ± 560	6200 ± 1500 20000 ± 4800
1k		21 ± 17 3,3 ± 3,3 10 ± 12	20000 ± 9600 146 ± 16 687 ± 165	>30000 >30000
1l		16 ± 6 1,1 ± 0,6 0,6 ± 0,4	3600 ± 1500 <14 140 ± 53	3400 ± 1300 12000 ± 5200
1m		14 ± 3 2,0 ± 0,8 2,7 ± 0,3	1400 ± 590 <14 276 ± 30	2300 ± 850 3400 ± 1000
1n		35 ± 14 3,8 ± 2,8 2,5 ± 1,4	8900 ± 5700 148 ± 32 205 ± 65	20000 ± 11000 23000 ± 7800
1o		59 ± 13 1,0 ± 0,3 1,9 ± 0,8	24000 ± 7500 502 ± 41 485 ± 323	>30000 >30000
1p		807 ± 81 268 ± 108 206 ± 46	24000 ± 5600 2100 ± 510 2700 ± 1600	>30000 >30000
1q		69 ± 16 18 ± 12 21 ± 5	13000 ± 4600 434 ± 97 361 ± 192	>30000 >30000
Gefitinib	-	0,2 ± 0,1 <0,1 185 ± 98	1700 ± 790 <14 11000 ± 2600	11000 ± 4900 19000 ± 12000
Afatinib	-	<0,1 <0,1 0,3 ± 0,1	634 ± 312 <14 653 ± 109	1300 ± 520 1500 ± 430
Osimer- tinib	-	1,0 ± 0,6 0,7 ± 0,6 0,3 ± 0,0	756 ± 340 <14 16 ± 5	2800 ± 360 1800 ± 260

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen an A431 und H1975 Zellen wurde der inhibitorische und selektive Effekt der Verbindungen **1l**, **1n** und **1o** auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung des EGFR nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass so die Aktivierung weiterer Kinasen der Signalkaskade effektiv Inhibiert wurde (Abbildung 8 und Anhang, Abbildung A2).<sup>§</sup> Diese Untersuchung stellt einen weiteren Nachweis dar, dass hier eine gezielte *on-Target*-Inhibition des EGFR stattfindet.<sup>[130]</sup>



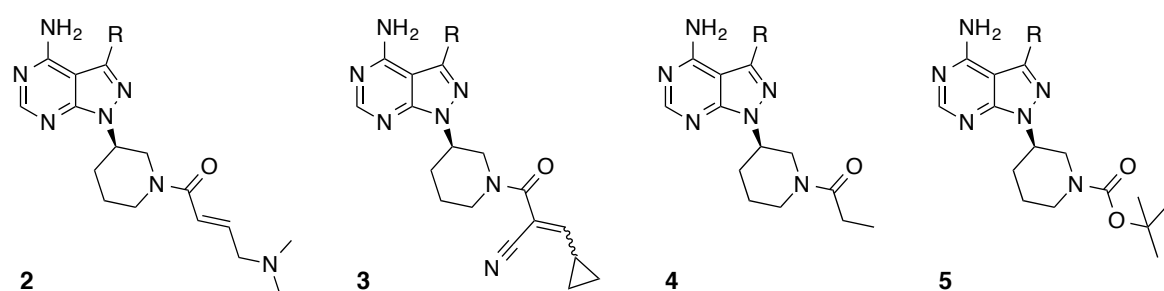
**Abbildung 8.** Western Blot-Analysen von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren in H1975 Zellen.

Im Weiteren wurden Pyrazolopyrimidin-Inhibitoren mit alternativen Elektrophilen (**2a–2b**, **3a–3e**), sowie die reversible Gegenstücke (**4a–4e**, **5a–5d**) getestet (Tabelle 5). Die Verbindungen **2a–2b** weisen ein *N,N*-Dimethylaminocrotonamid als Elektrophil auf, welches durch die Basizität die Reaktivität des Cys797 erhöhen und sich positiv auf die Löslichkeit der Verbindung auswirken kann.<sup>[50]</sup> In diesem Fall wurde jedoch ein deutlicher Abfall der inhibitorischen Potenz festgestellt. Vermutlich ist die Gruppe in dieser Orientierung nicht optimal für die Bindung in die aktive Tasche. Die Elektrophile der Verbindungen **3a–3e** weisen Elektronenziehende Gruppen auf, die es ermöglichen, dass die Bindung an Cys797 beim proteasomalen Abbau des Proteins gespalten wird. So bleiben keine kovalenten Addukte zurück, die unter Umständen eine Immun-Antwort des Körpers hervorrufen.<sup>[131]</sup> Verbindung **3c** zeigte zwar in biochemischen Assays einen IC<sub>50</sub> von 20 nM gegenüber T790M-mutiertem EGFR, jedoch einen EC<sub>50</sub> von über 8 µM in zellulären Assays. Auch hier verhindert der sterische Anspruch der Gruppe vermutlich eine effiziente Protein-Bindung. Für diese Elektrophile wurde bereits zuvor eine geringe Effektivität festgestellt.<sup>[132]</sup>

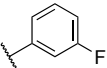
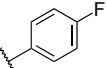
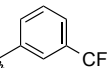
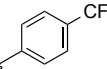

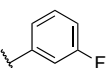
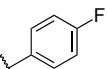
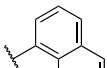
<sup>§</sup> Western-Blot-Analysen durch: J. Ketzer, T. Mühlenberg (AG S. Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen)

Für die reversiblen Verbindungen **4a–4e** und **5a–5d** wurde kein Effekt auf die Enzym-Aktivität des Wirkstoff-resistenten EGFR im Bereich bis 10  $\mu$ M festgestellt und auch kein Effekt auf die Viabilität der getesteten Zelllinien. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass diese Klasse von Inhibitoren weitestgehend auf die kovalente Bindung an das Zielprotein angewiesen ist, um potente Inhibition des Enzyms zu erreichen.

**Tabelle 5.** Biochemische und zelluläre Evaluation von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit unterschiedlichen Substitutionen des Piperazin-Rings.



Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>2a</b>		2300 ± 1500 218 ± 170 6600 ± 1800	30000 ± 390 1200 ± 450 30000 ± 260	>30000 >30000
<b>2b</b>		7300 ± 3400 1000 ± 480 6100 ± 4100	14000 ± 1600 6400 ± 1600 21000 ± 3000	>30000 >30000
<b>3a</b>		5400 ± 3900 230 ± 62 4500 ± 540	>30000 >30000	n.b. n.b.
<b>3b</b>		>10000 385 ± 207 2500 ± 420	27000 ± 5300 n.b. >30000	n.b. n.b.
<b>3c</b>		96 ± 26 9,6 ± 7,9 20 ± 13	8400 ± 1900 n.b. 11000 ± 1200	n.b. n.b.
<b>3d</b>		338 ± 69 85 ± 34 213 ± 49	14000 ± 3600 n.b. 28000 ± 2100	n.b. n.b.
<b>3e</b>		102 ± 75 21 ± 20 80 ± 51	>30000 n.b. >30000	n.b. n.b.
<b>4a</b>		>10000 4700 ± 1700 >10000	>30000 >30000 >30000	>30000 >30000

Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
4b		>10000 3400 ± 2100 >10000	>30000 22000 ± 4900 >30000	>30000 >30000
4c		>10000 5000 ± 4600 >10000	>30000 26000 ± 3600 >30000	>30000 >30000
4d		>10000 >10000 >10000	>30000 >30000 >30000	>30000 >30000
4e		6500 ± 2800 5900 ± 2600 >10000	>30000 24000 ± 7000 >30000	>30000 >30000
5a		n.b. n.b. n.b.	25000 ± 4600 >30000 >30000	>30000 >30000
5b		n.b. n.b. n.b.	28000 ± 1600 >30000 >30000	>30000 >30000
5c		n.b. n.b. n.b.	29000 ± 1800 >30000 >30000	>30000 >30000
5d		n.b. n.b. n.b.	>30000 >30000 28000 ± 4300	>30000 >30000

Da die Ausbildung der kovalenten Bindung hier eine essentielle Rolle spielt, wurde vermutet, dass die Mutation des reaktiven Cysteins (C797S) einen deutlichen, negativen Einfluss auf die Aktivität gegenüber dieser Mutante bewirkt. Im Rahmen der Arbeiten von Engel und Becker, *et al.*<sup>[130]</sup> wurden daher die inhibitorischen Aktivitäten gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S bestimmt, sowie eine Analyse der Bindungskinetik durchgeführt.\*\* Man geht davon aus, dass ein Inhibitor zunächst reversibel in die Bindetasche binden muss und in einem zweiten Schritt kann dann die kovalente Bindung mit dem Protein ausgebildet werden, wenn das Elektrophil in räumlicher Nähe zur reaktiven Seitenkette ausgerichtet wurde.<sup>[133]</sup> Gemessen wird dabei die Bindungsaffinität  $K_i$  und die Rate der Bindungsbildung  $k_{\text{inact}}$ . Analyse der Verbindungen **1l**, **1n** und **1o** zeigte deutliche Unterschiede in

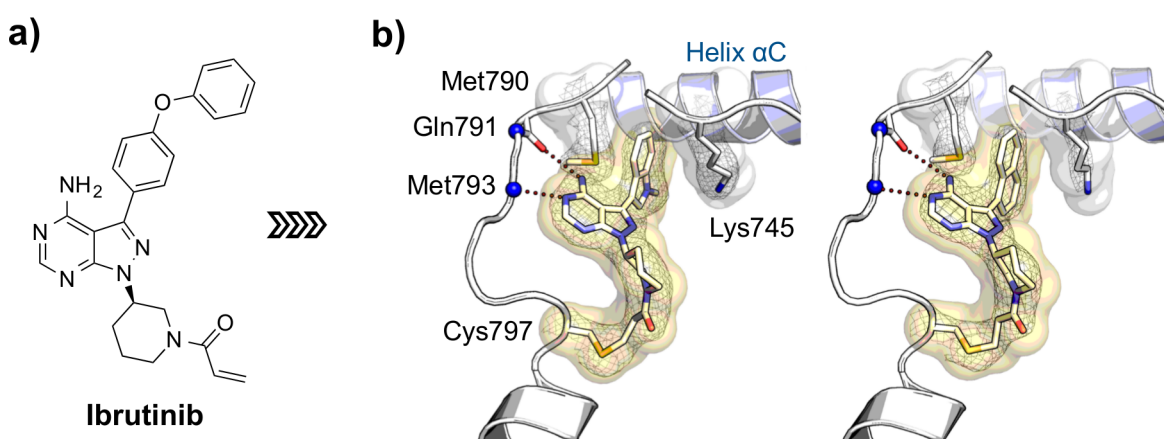
\*\* Biochemische Charakterisierung der Mutante EGFR-L858R/T790M/C797S und Messung der Bindungskinetik durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)



der Inhibition der C797S-mutierten EGFR-Variante mit  $IC_{50}$ -Werten von 88 nM bis 8  $\mu$ M (Tabelle 6). Es wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen diesen Aktivitäts-Daten und der Bindungskinetik besteht: Verbindung **1l** weist gegenüber EGFR-L858R/T790M einen hohen reversiblen Bindungsanteil auf ( $K_i = 1,5$  nM), ist dadurch weniger auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung angewiesen ( $k_{inact} = 0,17$  min<sup>-1</sup>) und erreicht so eine vergleichsweise potente Inhibition des EGFR-L858R/T790M/C797S ( $IC_{50} = 88$  nM). Die Art der Substitution der C3-Position des Pyrazolopyrimidins hat dabei einen deutlichen Einfluss auf die Bindungskinetik der Verbindungen. Verbindung **1l** mit 2-Naphthyl-Substituent zeigte einen deutlich kleineren  $K_i$ -Wert, verglichen mit Methyldol-3-yl oder 1-Naphthyl Substituenten der Verbindungen **1n** bzw. **1o** und kann die Bindetasche offensichtlich effizienter besetzen. Hingegen zeigten **1n** und **1o** eine deutlich schnellere Bindungsbildung  $k_{inact}$  und können daher die C797S-Mutante nicht potent inhibieren.

Die Bindungskinetik von kovalenten Inhibitoren in EGFR-L858R/T790M eignet sich also als Maß für die biochemische Inhibition der C797S-Mutante und ein hoher reversibler Bindungsanteil dieser Liganden ist ein erforderliches Kriterium für die EGFR-TKIs der vierten Generation.

Im Weiteren war es möglich, die Kristallstrukturen der Verbindungen **1n** und **1o** in Komplex mit Türsteher-mutiertem EGFR zu lösen (PDB IDs: 5J9Z, 5J9Y) und so einen Einblick in den Bindungsmodus dieser Inhibitoren zu bekommen (Abbildung 9b).<sup>††</sup> Die kovalente Bindung zwischen Acrylamid und Cys797 ist in der Elektronen-Dichte deutlich aufgelöst und konnte so nachgewiesen werden. Die bzyklischen Substituenten der 3-Position besetzen eine Tasche zwischen Methionin-Türsteher, dem katalytischen Lys745 und der Helix  $\alpha$ C.



**Abbildung 9.** a) Struktur des BTK Inhibitors Ibrutinib. b) Kristallstruktur-Analysen von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren **1n** und **1o** im Komplex mit EGFR-T790M (PDB IDs: 5J9Z, 5J9Y).<sup>[130]</sup>

<sup>††</sup> Lösen der Kristallstrukturen durch: C. Becker im Rahmen seiner Dissertation<sup>[134]</sup>

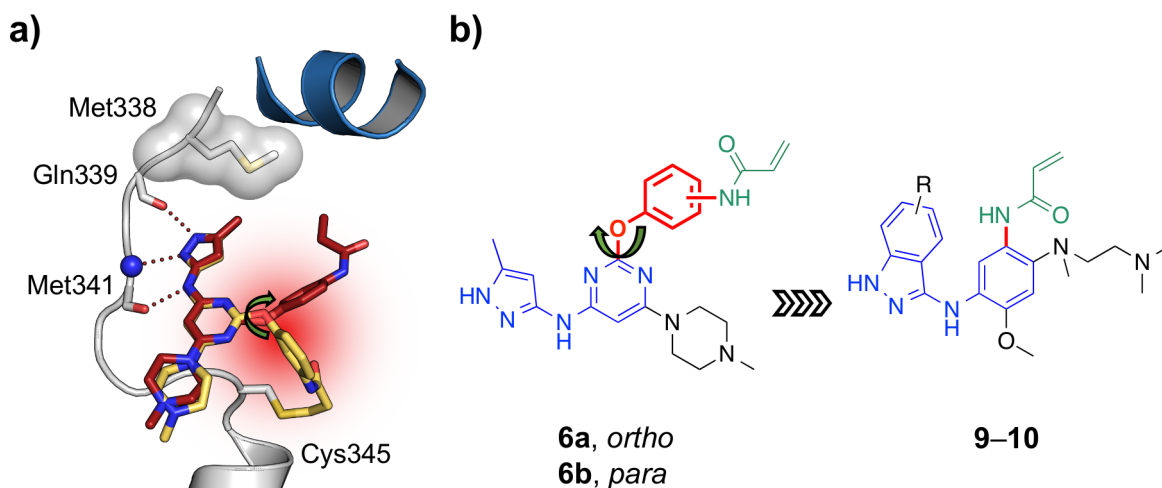
**Table 6.** Analyse der Bindungskinetik von Aminopyrazolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

Cpd	EGFR	HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	K <sub>i</sub> [nM]	k <sub>inact</sub> [min <sup>-1</sup> ]	k <sub>inact</sub> /K <sub>i</sub> [μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>1l</b>	WT	16 ± 6	15 ± 3,2	0,19 ± 0,12	0,21 ± 0,05
	L858R	1,1 ± 0,6	1,6 ± 0,4	0,14 ± 0,01	1,60 ± 0,53
	L858R/T790M	0,6 ± 0,4	1,5 ± 0,8	0,17 ± 0,02	3,42 ± 1,44
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	88 ± 16	49 ± 14	-	-
<b>1n</b>	WT	35 ± 14	25 ± 7,2	0,11 ± 0,03	0,08 ± 0,02
	L858R	3,8 ± 2,8	19 ± 3,1	0,17 ± 0,08	0,14 ± 0,07
	L858R/T790M	2,5 ± 1,4	16 ± 5,2	0,29 ± 0,02	0,36 ± 0,09
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	838 ± 85	1008 ± 372	-	-
<b>1o</b>	WT	58 ± 13	47 ± 5,8	0,13 ± 0,05	0,05 ± 0,04
	L858R	1,0 ± 0,3	44 ± 6,5	0,25 ± 0,06	0,10 ± 0,06
	L858R/T790M	1,9 ± 0,8	58 ± 3,3	0,31 ± 0,04	0,09 ± 0,02
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	7900 ± 3700	1068 ± 432	-	-
<b>Osi-mer-tinib</b>	WT	1,0 ± 0,6	14 ± 2,3	0,43 ± 0,11	0,52 ± 0,05
	L8585R	0,7 ± 0,6	1,6 ± 0,3	0,30 ± 0,01	3,24 ± 0,46
	L858R/T790M	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,33 ± 0,06	3,75 ± 0,39
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	77 ± 22	25 ± 9,6	-	-
<b>Rocile-tinib</b>	WT	10 ± 1	74 ± 7,1	0,18 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	L8585R	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,18 ± 0,05	1,67 ± 0,32
	L858R/T790M	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,29 ± 0,05	2,95 ± 0,66
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	69 ± 13	76 ± 40	-	-
<b>EGF 816</b>	WT	1,7 ± 0,8	25 ± 7,8	0,31 ± 0,06	0,23 ± 0,13
	L8585R	0,6 ± 0,3	10 ± 2,7	0,22 ± 0,02	0,38 ± 0,08
	L858R/T790M	0,3 ± 0,1	7,7 ± 2,3	0,15 ± 0,04	0,38 ± 0,10
	L858R/T790M/C797S <sup>a</sup>	196 ± 21	433 ± 151	-	-

<sup>a</sup> Assay-Konstrukt abweichend von dem im Folgenden verwendeten Konstrukt

### 3.2.2. Optimierung der Bindungsgeometrie von kovalenten TKIs

Im Rahmen der Arbeiten von Tomassi und Lategahn, *et al.*<sup>[135]</sup> wurde eine Serie von Aminoindazol-basierten Inhibitoren des EGFR synthetisiert und charakterisiert.<sup>††,†,‡,\*\*</sup> Diese basierten auf in Vorarbeiten durch Hit-Optimierung erhaltenen Verbindungen **6a–6b**.<sup>[136]</sup> Computer-gestützte Berechnungen haben gezeigt, dass das Acrylamid dieser Verbindungen durch den Phenoxy-Linker eine gewisse Flexibilität aufweist, wodurch die kovalente Bindungs-Bildung nur langsam stattfinden kann, wie Analyse der Bindungskinetik bestätigte (Tabelle 8). Es konnten Co-Kristallstrukturen in cSrc als Modellsystem für EGFR<sup>[26,137]</sup> mit den Inhibitoren **6a** und **6b**, welche sich ausschließlich durch die *ortho*- bzw. *para*-Substitution des Acrylamids am Phenoxy-Linker unterscheiden, erhalten werden (PDB IDs: 5D11, 5D10). Diese zeigten deutlich unterschiedliche Orientierungen der Linker-Gruppen und illustrieren die hohe Flexibilität bedingt durch die Anzahl der frei drehbaren Bindungen (Abbildung 10a).<sup>[136]</sup> Daher wurden die Moleküle **9–10** entworfen, bei denen das Elektrophil direkt verknüpft ist (Abbildung 10b).



**Abbildung 10.** a) Kristallstruktur-Analyse der Verbindung **6a** und **6b** im Komplex mit cSrc-T38M/S345C als Modellsystem für EGFR-T790M (PDB IDs: 5D11, 5D10). b) Design von Aminoindazol-basierten Inhibitoren **9–10** mit verringerter Flexibilität des Acrylamid-Linkers.<sup>[135]</sup>

†† Synthese der Verbindungen durch: S. Tomassi (AG D. Rauh, TU Dortmund)

† Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

‡ Zelluläre Charakterisierung der Zelllinien HCC827, H358 & A549 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

\*\* Biochemische Charakterisierung der Mutante EGFR-L858R/T790M/C797S und Messung der Bindungskinetik durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

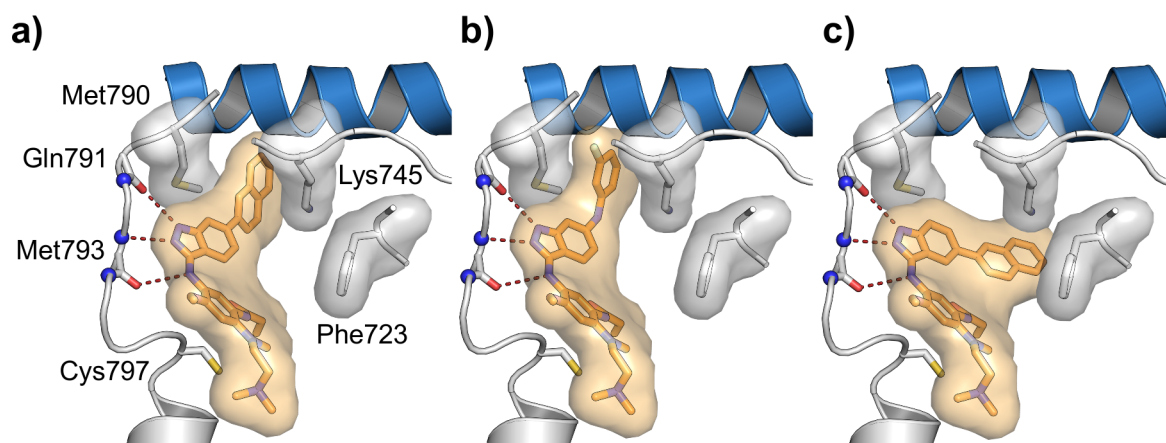
Dazu wurde ein erstes Set der Inhibitoren **7a–7b** und **8a–8b** getestet. Der Vergleich der kovalenten Verbindungen **7a** und **8a** mit den reversiblen Gegenstücken **7b** und **8b** weist deutlich auf einen kovalenten Wirkmechanismus der Inhibitoren hin, da die reversiblen Verbindungen keine Inhibition der Kinase-Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten unter  $8\text{ }\mu\text{M}$  zeigten. Die kovalenten Verbindungen zeigten deutliche Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR im biochemischen und zellulären Assay, welche für Verbindung **8a**, die eine Methoxy-Gruppe aufweist, besonders ausgeprägt ist. Hier wurde biochemisch ein  $IC_{50}$  von knapp  $500\text{ nM}$  und zellulär ein  $EC_{50}$  von  $3,5\text{ }\mu\text{M}$  gegenüber Türlsteher-mutiertem EGFR bestimmt (Tabelle 7).

**Tabelle 7.** Biochemische und zelluläre Evaluation des ersten Sets von Aminoindazol-basierten Inhibitoren.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>7a</b>, R = </p> <p><b>7b</b>, R = </p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>8a</b>, R = </p> <p><b>8b</b>, R = </p> </div> </div>			
Cpd	EGFR HTRF $IC_{50}$ [nM]	EGFR CTG $EC_{50}$ [nM]	kRas CTG $EC_{50}$ [nM]
	WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>7a</b>	>10000 >10000 $2600 \pm 110$	$6000 \pm 2300$ $9800 \pm 1600$ $6900 \pm 2400$	$11000 \pm 5700$ $8000 \pm 1100$
<b>7b</b>	>10000 $8500 \pm 880$ $9700 \pm 160$	>30000 >30000 >30000	>30000 >30000
<b>8a</b>	$9300 \pm 460$ $3400 \pm 650$ $462 \pm 60$	$1000 \pm 4200$ $4700 \pm 760$ $3500 \pm 1700$	$20000 \pm 2200$ $24000 \pm 5600$
<b>8b</b>	>10000 >10000 >10000	>30000 >30000 >30000	>30000 >30000

Die positiven Ergebnisse des ersten Sets an Inhibitoren begründete im Folgenden die Weiterentwicklung der Aminoindazole mit Methoxy-Seitenkette als EGFR-Inhibitoren. Basierend auf den Kristallstrukturen in dem etablierten cSrc-T338M/S345C Modellsystem für EGFR-T790M<sup>[26,137]</sup> (PDB ID: 5D11) wurde der Bindemodus der Aminoindazole abgeleitet. Diese wurden manuell übereinander gelegt, um die drei Wasserstoff-Brückenbindungen zur Scharnierregion zu bilden.

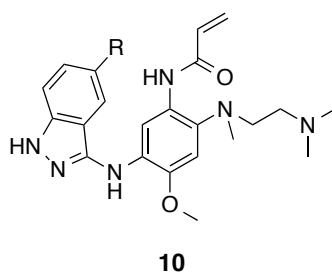
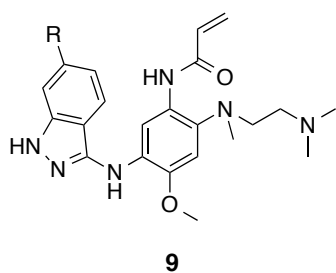
Durch ein Alignment mit der EGFR-Kristallstruktur in Komplex mit Pyrazolopyrimidin-Inhibitor **1o** (PDB ID: 5J9Y) wurde ein möglicher Bindemodus in der aktiven Tasche des EGFR erhalten. Es wurde deutlich, dass Substituenten in 6-Position des Indazol-Rings vermutlich die Tasche zwischen Met790, Lys745 und Helix  $\alpha$ C besetzen können (Abbildung 11a–b). Im Weiteren wurden auch Substituenten in 5-Position eingeführt, die vermutlich unpolare Wechselwirkungen mit Phe723 ausbilden können (Abbildung 11c).



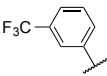
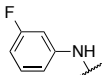
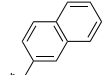
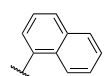
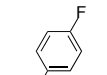
**Abbildung 11.** Angenommener Bindungsmodus von Aminoindazol-basierten Inhibitoren **9a**, **9l** und **10a** (Modell basierend auf PDB IDs: 5D11, 5J9Y).<sup>[135]</sup>

Die korrespondierenden Verbindungen **9** bzw. **10** wurden biochemisch und zellulär charakterisiert (Tabelle 8). Im ersten Schritt wurden bizyklische Verbindungen **9a–9d** getestet, davon zeigten sich die Stickstoff-haltigen Verbindungen **9c** und **9d** als besonders potent im zellulären Kontext, mit  $EC_{50}$  Werten unter  $1\ \mu\text{M}$ . Verbindung **9c** mit einem 6-Isochinolin-Substituenten zeigte nur schwache Selektivität über EGFR Wild-Typ und der  $EC_{50}$  von  $659\ \text{nM}$  gegenüber kRas-mutierten A549 Zellen lässt auf einen leicht zytotoxischen Charakter dieser Verbindung schließen. Hingegen zeigte die Verbindung **9d** mit einem Methyldiol-Rest deutliche Selektivität im biochemischen Assay mit  $IC_{50}$ -Werten von  $9,3$  und  $4,8\ \text{nM}$  gegenüber EGFR-WT bzw. Türsteher-mutierter Variante. Die Potenz dieser Verbindung wurde ebenfalls in H1975 Zellen nachgewiesen, mit einem  $EC_{50}$  von  $417\ \text{nM}$ , während die Viabilität von kRas-Zellen erst bei Konzentrationen über  $2\ \mu\text{M}$  beeinträchtigt wurde. Daraufhin wurde ein weiteres Set an Verbindungen mit Phenyl-Substituenten mit eingebauten Stickstoff-Atomen **9e–9h** getestet. Davon zeigte Verbindung **9f** mit 4-Pyridin-Substituenten die höchste Potenz gegenüber EGFR-L858R/T790M im biochemischen Assay ( $IC_{50} = 5,0\ \text{nM}$ ), sowie in Zellen ( $EC_{50} = 489\ \text{nM}$ ) und eine gute Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR. Es wurde ein biochemischer  $IC_{50}$  von  $30\ \text{nM}$  und in A431 Zellen ein  $EC_{50}$  von knapp  $4\ \mu\text{M}$  bestimmt. kRas-mutierte H358 und A549 Zellen wurden nur schwach

beeinträchtigt mit  $EC_{50}$ -Werten von knapp 6  $\mu$ M. Verbindungen **9g** und **9h** mit Dimethylanilin-Resten zeigten schwache inhibitorische Potenz mit  $EC_{50}$ -Werten über 1  $\mu$ M in H1975 Zellen. Nachfolgend wurden die fluorierten Verbindungen **9i–9k** getestet, welche jedoch doppelt mutierten EGFR im zellulären Kontext halb-maximal nur mit Dosen von über 600 nM inhibierten. Im Weiteren wurde Verbindung **9l** getestet, die einen Amin-verbrückten Fluorophenyl-Substituenten in 6-Position aufweist. Diese zeigte hohe Potenz im biochemischen Assay mit sub-nanomolaren inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50} < 1$  nM). Eine hohe Aktivität wurde ebenfalls im zellulären Assay nachgewiesen mit einem  $EC_{50}$  von 191 nM in H1975 Zellen und ein  $EC_{50}$  von 3,1  $\mu$ M in A431 Zellen zeigt deutliche Selektivität der Verbindung **9l** gegenüber EGFR-WT. Die angenommenen Bindemodi liefern eine gute Erklärung für die hohe Effektivität dieser Verbindung: Direkt verknüpfte aromatische Ringsysteme, wie z.B. der Verbindung **9a**, müssen einen ungünstigen Winkel von ca. 45° zwischen Grundgerüst und Substituenten einnehmen, um die Bindetasche zwischen Türsteher und katalytischem Lys745 zu besetzen (Abbildung 11a). Die Verbrückung der aromatischen Seitenkette durch ein sekundäres Amin, wie in Verbindung **9l**, ermöglicht eine Flexibilität der Gruppe und weist damit vermutlich weniger konformationelle Hinderung während der Bindung in die aktive Tasche auf (Abbildung 11b). Die Testung weiterer Verbindungen mit flexiblen Gruppen, wie z.B. Benzyl-Substituenten, wäre an der Stelle interessant gewesen. Abschließend wurden drei Verbindungen mit aromatischen Seitenketten in 5-Position des Indazols (**10a–10c**) getestet. Von diesen zeigte Verbindung **10c** hohe Selektivität und potente Inhibition der Wirkstoff-resistenten Mutante des EGFR. Im biochemischen Kontext wurde sub-nanomolare Inhibition des EGFR-L858R/T790M nachgewiesen, während gegenüber EGFR-WT ein  $IC_{50}$  von 6,8 nM bestimmt wurde. Die zelluläre Aktivität gegenüber H1975 Zellen war jedoch vergleichsweise moderat mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 694 nM. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut den positiven Effekt von polaren, Heteroatom-enthaltenden Verbindungen (z.B. **9f**) im Vergleich zu Verbindungen mit fluorierten Substituenten.

**Tabelle 8.** Biochemische und zelluläre Evaluation des zweiten Sets von Aminoindazol-basierten Inhibitoren.

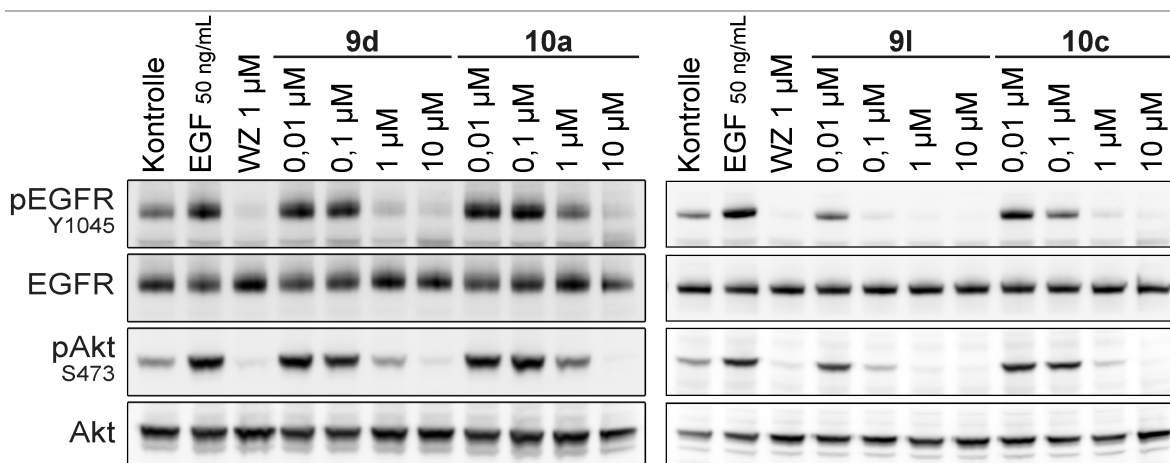
Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>9a</b>		312 ± 104 25 ± 2 85 ± 2	1700 ± 260 2300 ± 590 1600 ± 230	3000 ± 670 2900 ± 1100
<b>9b</b>		1,4 ± 0,2 <1 4,3 ± 2,5	3200 ± 570 121 ± 40 1100 ± 180	4300 ± 740 2300 ± 500
<b>9c</b>		2,8 ± 0,3 1,1 ± 0,1 6,0 ± 3,8	2800 ± 1300 162 ± 86 632 ± 323	4700 ± 1900 659 ± 193
<b>9d</b>		9,3 ± 1,2 1,5 ± 0,4 4,8 ± 2,0	2200 ± 400 400 ± 138 417 ± 159	2300 ± 550 2200 ± 410
<b>9e</b>		97 ± 10 29 ± 1 15 ± 0	5700 ± 1100 730 ± 88 1000 ± 380	8700 ± 1000 6900 ± 2700
<b>9f</b>		30 ± 2 14 ± 3 5,0 ± 0,5	3900 ± 280 106 ± 19 489 ± 150	5800 ± 1400 5600 ± 1500
<b>9g</b>		48 ± 4 10 ± 1 22 ± 3	3500 ± 370 734 ± 212 1300 ± 120	5300 ± 750 3600 ± 1800
<b>9h</b>		387 ± 21 80 ± 4 72 ± 3	1400 ± 50 2500 ± 470 1100 ± 350	1600 ± 330 1400 ± 180
<b>9i</b>		5,0 ± 0,4 1,6 ± 0,1 5,0 ± 0,8	2300 ± 750 97 ± 18 608 ± 180	3500 ± 800 3000 ± 1100
<b>9j</b>		26 ± 4 8,5 ± 3,3 10 ± 1	2200 ± 430 765 ± 154 659 ± 288	3700 ± 340 2900 ± 570

Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>9k</b>		16 ± 4	3500 ± 500	4700 ± 1300
		4,5 ± 0,3	856 ± 89	3700 ± 860
		38 ± 11	1900 ± 430	
<b>9l</b>		<1	3100 ± 1300	2700 ± 1100
		<1	22 ± 8	1600 ± 960
		<1	191 ± 105	
<b>10a</b>		8,1 ± 2,1	1800 ± 300	3100 ± 720
		2,2 ± 0,3	1100 ± 60	2900 ± 930
		1,1 ± 0,2	960 ± 238	
<b>10b</b>		33 ± 6	2800 ± 260	5000 ± 560
		12 ± 1	1800 ± 390	3400 ± 430
		2,7 ± 0,9	2100 ± 450	
<b>10c</b>		6,8 ± 0,2	2100 ± 670	3400 ± 910
		2,0 ± 0,7	459 ± 110	3000 ± 930
		<1	694 ± 68	

Die Verbindungen **9d**, **9l**, **10a** und **10c** wurden weiterhin auf ihr Potential, die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten Signalkaskade zu inhibieren, untersucht. Dazu wurden A431 und H1975 Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt und mittels Western-Blot untersucht (Abbildung 12 und Anhang, Abbildung A3).<sup>§</sup> Die hohe Potenz der Verbindungen **9l** und **9d** in EGFR-mutierten H1975 Zellen konnte hier bestätigt werden, mit einem inhibitorischen Effekt auf pEGFR, sowie pAkt bei Konzentrationen in der Größenordnung der im CellTiter-Glo-Assay bestimmten EC<sub>50</sub>-Werte. Die Verbindungen **10a** und **10c** zeigen trotz potenter Inhibition der Kinase-Domäne im biochemischen Kontext einen vergleichsweise geringen Effekt auf Krebszellen und die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade. Für die getesteten Verbindungen konnte eine etwa 10-fache Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR beobachtet werden.

<sup>§</sup> Western-Blot-Analysen durch: J. Ketzer, T. Mühlenberg (AG S. Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen)





**Abbildung 12.** Western Blot-Analysen von Aminoindazol-basierten Inhibitoren in H1975 Zellen.

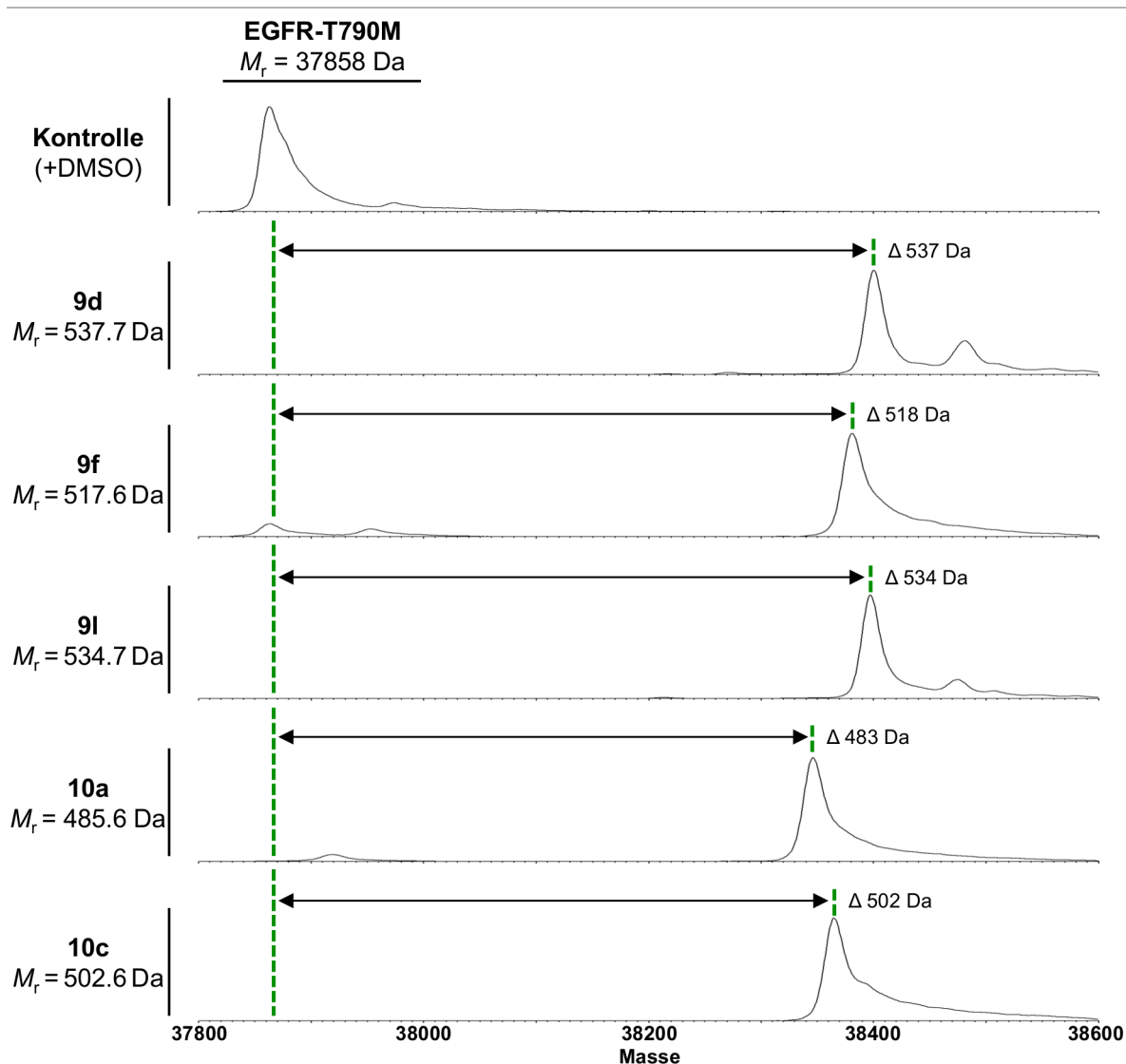
Inkubation der jeweiligen Inhibitoren **9d**, **9f**, **9l**, **10a** und **10c** mit der Kinase-Domäne des EGFR-T790M und anschließende Analyse mittels ESI/MS zeigte eine Massen-Zunahme entsprechend der einfach-Modifikation des Rezeptors im Vergleich zur unbehandelten Kinase (Abbildung 13). Die Ausbildung einer kovalenten Bindung mit Türsteher-mutiertem EGFR konnte so nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden diese Inhibitoren auf ihre metabolische Stabilität in humanen und Maus Leber-Mikrosomen, sowie im Blutplasma getestet.<sup>§§</sup> Die untersuchten Inhibitoren wiesen verglichen mit klinisch Eingesetzten EGFR-TKIs einen sehr geringen Abbau durch Mikrosomen auf. Sie zeigten >75% Stabilität in humanem Plasma, wobei die Stabilität in Maus-Plasma über 90% lag (Anhang, Tabelle A2).

Die getesteten Indazol-basierten EGFR-TKIs sollten insbesondere im Bezug auf eine optimale kovalente Bindungs-Rate mit Cys797 optimiert sein, verglichen mit Verbindung **6c**. Für diese wurde ein  $k_{\text{inact}}$  von lediglich  $0,14 \text{ min}^{-1}$  bestimmt und die Flexibilität des Linkers zwischen Grundgerüst und Acrylamid sollte für die Verbindungsklassen **9** und **10** deutlich verringert werden (Tabelle 9). Für die Verbindungen **9d** und **10a** wurde die Bindungs-Kinetik daher analog bestimmt und mit  $0,37$  bzw.  $0,50 \text{ min}^{-1}$  bemerkenswert schnelle Raten der Bindungs-Bildung beobachtet. Es lässt sich also ableiten, dass diese Verbindungsklasse eine optimierte Ausrichtung des Acrylamids aufweist. Die dabei bestimmten reversiblen Bindungsanteile  $K_i$  waren vergleichsweise schwach mit  $149$  bzw.  $28 \text{ nM}$ . Da diese Verbindungen offensichtlich weitestgehend auf kovalenter Modifikation der Bindetasche angewiesen sind um potent binden zu können, ist es wenig

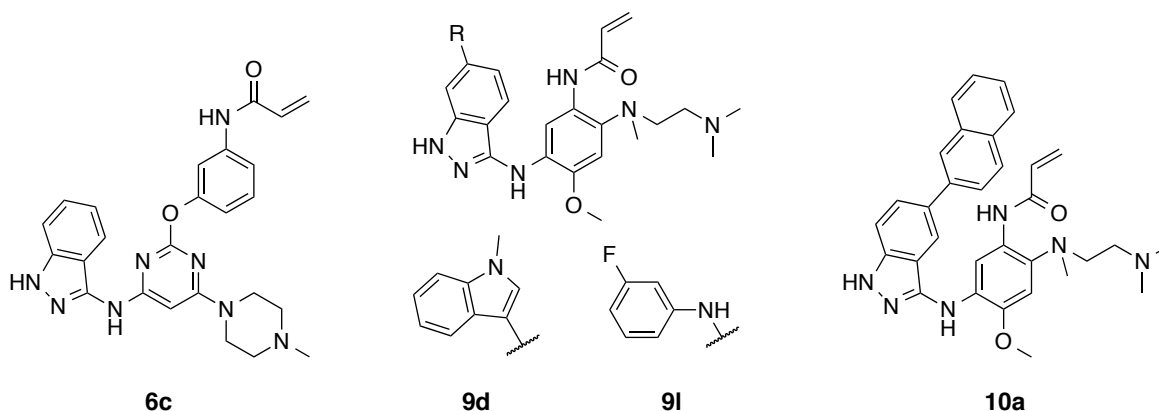
<sup>§§</sup> Messung der ADME-Parameter durch: M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht (Lead Discovery Center GmbH, LDC, Dortmund)

überraschend, dass diese Verbindungen keine inhibitorische Aktivität gegenüber der C797S-mutierten Variante des EGFRs aufweisen. Verbindung **9l** zeigt hingegen deutlich höhere Bindungs-Affinitäten ( $K_i = 7,4 \text{ nM}$ ), wodurch die Hypothese einer optimierten Bindung der Sub-Tasche zwischen Met790 und Lys745 durch den flexibleren Anilin-Substituenten weiter gestützt wird. Interessanterweise wurde trotz der erhöhten reversiblen Affinität kein inhibitorischer Effekt auf EGFR-L858R/T790M/C797S für **9l** im Bereich bis  $10 \mu\text{M}$  festgestellt.<sup>\*\*, [135]</sup> Die Optimierung der kovalenten Bindungs-Eigenschaften resultiert also lediglich in potenten Inhibitoren des EGFR-L858R/T790M.



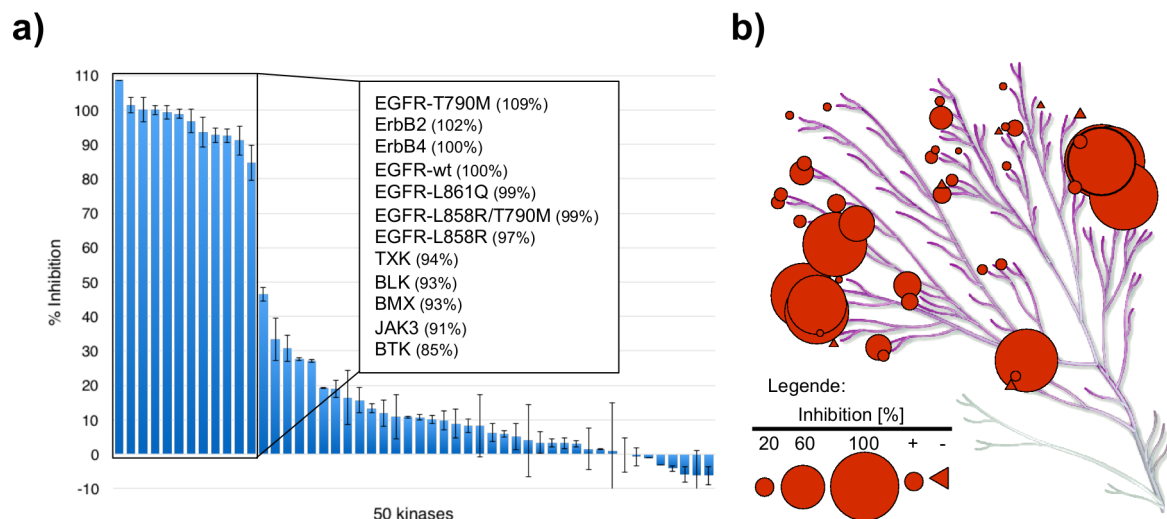
**Abbildung 13.** Massenspektrometrische Analyse der kovalenten Bindungsbildung von ausgewählten Aminoindazol-basierten Inhibitoren mit EGFR-T790M.

<sup>\*\*</sup> Biochemische Charakterisierung der Mutante EGFR-L858R/T790M/C797S und Messung der Bindungskinetik durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

**Tabelle 9.** Analyse der Bindungskinetik von Aminoindazol-basierten Inhibitoren.

Cpd	EGFR	HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	K <sub>i</sub> [nM]	k <sub>inact</sub> [min <sup>-1</sup> ]	k <sub>inact</sub> /K <sub>i</sub> [μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>6c</b>	WT	1700 ± 500	-	-	-
	L8585R	503 ± 206	833 ± 429	0,06 ± 0,02	<0,01
	L858R/T790M	68 ± 34	0,32 ± 0,10	0,14 ± 0,09	7,01 ± 4,83
	L858R/T790M/C797S	4100 ± 2000	-	-	-
<b>9d</b>	WT	9,3 ± 1,2	236 ± 89	0,28 ± 0,02	0,02 ± 0,00
	L8585R	1,5 ± 0,4	57 ± 18	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,02
	L858R/T790M	4,8 ± 2,0	149 ± 45	0,37 ± 0,09	0,04 ± 0,03
	L858R/T790M/C797S	>10000	-	-	-
<b>9l</b>	WT	<1	5,1 ± 1,4	0,14 ± 0,08	0,47 ± 0,12
	L8585R	<1	3,9 ± 1,0	0,09 ± 0,05	0,40 ± 0,25
	L858R/T790M	<1	7,4 ± 3,6	0,17 ± 0,12	0,39 ± 0,16
	L858R/T790M/C797S	>10000	-	-	-
<b>10a</b>	WT	8,1 ± 2,1	147 ± 42	0,18 ± 0,09	0,02 ± 0,00
	L8585R	2,2 ± 0,3	105 ± 29	0,14 ± 0,07	0,02 ± 0,02
	L858R/T790M	1,1 ± 0,2	28 ± 4	0,50 ± 0,03	0,30 ± 0,13
	L858R/T790M/C797S	>10000	-	-	-

Zusätzlich wurde die Selektivität der Verbindung **9l** innerhalb von 50 repräsentativen Tyrosin-Kinasen untersucht. Dazu wurde ein SelectScreen Profiling bei Life Technologies bei einer Konzentration von 1 μM durchgeführt (Abbildung 14). Dabei wurde eine Inhibition von >97% für die ErbB-RTKs, sowie mutierte Varianten des EGFR festgestellt. Die Kinasen TXK, BLK, BMX, JAK3 und BTK zeigten eine Inhibition von über 85%, während **9l** alle weiteren getesteten Kinasen mit weniger als 50% Rest-Aktivität inhibierte. Da die genannten Kinasen ein Cystein in analoger Position zu Cys797 des EGFR aufweisen, ist zu vermuten, dass **9l** kovalent an diese Proteine bindet und die hohe Selektivität für diese Kinasen spricht weiter für den deutlich ausgeprägten kovalenten Charakter der Bindung der hier untersuchten Indazol-basierten EGFR-Inhibitoren.



**Abbildung 14.** Kinase Selektivitäts-Profilierung der Verbindung **9I** bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , generiert mittels SelectScreen Profiling Service von Life Technologies. **a)** Illustration als Wasserfall-Plot und als **b)** Kinase Dendrogramm, angepasst nach Kinome Render und die Illustration ist reproduziert großzügiger Weise von Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)).<sup>[138]</sup>

### 3.2.3. Potential von Inhibitoren erhalten durch Target-Hopping

Im Rahmen der Zusammenarbeit von Günther und Lategahn, *et al.*<sup>[139]</sup> wurde ebenfalls eine Optimierung der kovalenten Bindungs-Eigenschaften von EGFR Inhibitoren vorgenommen. Das reversible Pyridinylimidazol **11a** (Tabelle 10) wurden bei einer Substanz-Durchmusterung gegenüber Wild-Typ EGFR identifiziert, nachdem ähnliche p38 Inhibitoren EGFR *off-Target* Aktivität in einem Kinom-Profilung zeigten.<sup>[140]</sup> Eine vergleichsweise große Kollektion von Derivaten wurde synthetisiert, wobei auch reaktive Michael-Akzeptor-Systeme eingeführt wurden.<sup>#</sup> Diese Verbindungen wurden umfassend charakterisiert<sup>†,‡,\*\*</sup> und die Erkenntnisse daraus werden im Folgenden diskutiert.

In einem ersten Set von Verbindungen (**11a–11e**) wurde der Methyl-Thioether durch kurze alkyl-Ketten mit terminalen hetero-Atomen substituiert (Tabelle 10). Während ein Morpholin-Rest der Verbindung **11b** nicht toleriert wird ( $IC_{50} = 1,2 \mu M$ ), bewirkte die Einführung einer Aminoethylen-Kette eine erhöhte biochemische inhibitorische Aktivität der resultierenden Verbindung **11e** ( $IC_{50} = 29 \text{ nM}$ ) verglichen mit der ausgangs-Verbindung **11a** ( $IC_{50} = 130 \text{ nM}$ ) gegenüber EGFR-L858R/T790M. Verbindung **11f** mit einem Acrylamid anstelle des terminalen Amins zeigte eine schwächere Potenz (EGFR-L858R/T790M  $IC_{50} = 38 \text{ nM}$ ) im Vergleich zu Verbindung **11e**. Insbesondere der Vergleich zum reversiblen Gegenstück **11g**, welches einen  $IC_{50}$  von 52 nM gegenüber Wirkstoff-resistentem EGFR aufweist, zeigt deutlich, dass die Ausbildung der kovalenten Bindung nur ineffizient erfolgt und nur wenig zur inhibitorischen Potenz beitragen kann. In Übereinstimmung zeigte eine Analyse der Bindungskinetik sehr schwache Raten der Bindungsknüpfung von unter  $0,1 \text{ min}^{-1}$  für alle EGFR Mutations-Varianten (Tabelle 13). Analog dazu lieferten Docking-Studien unterschiedliche Konformationen der Alkyl-Kette in kovalentem und induced-fit Docking, während der H-Brücken-Kontakt zur Scharnier-Region identisch war (Abbildung 15a).<sup>#</sup> Bei kovalentem Docking wurde eine Bindungs-Pose für kovalent an Cys797 gebundene Verbindung **11f** generiert. Beim induced-fit Docking wurde diese Bindung nicht impliziert und das Amid-NH des Acrylamids tritt in Wechselwirkung mit der Seitenkette von Asp855, wodurch eine kovalente Modifikation des reaktiven Cysteins nicht möglich ist. Dennoch ist diese Interaktion für die Bindung vorteilhaft, wie der Vergleich zu Verbindung **11h** zeigt, welche anstelle des Acrylamids lediglich ein Keton aufweist. Hier wurde ein deutlich erhöhter  $IC_{50}$ -Wert

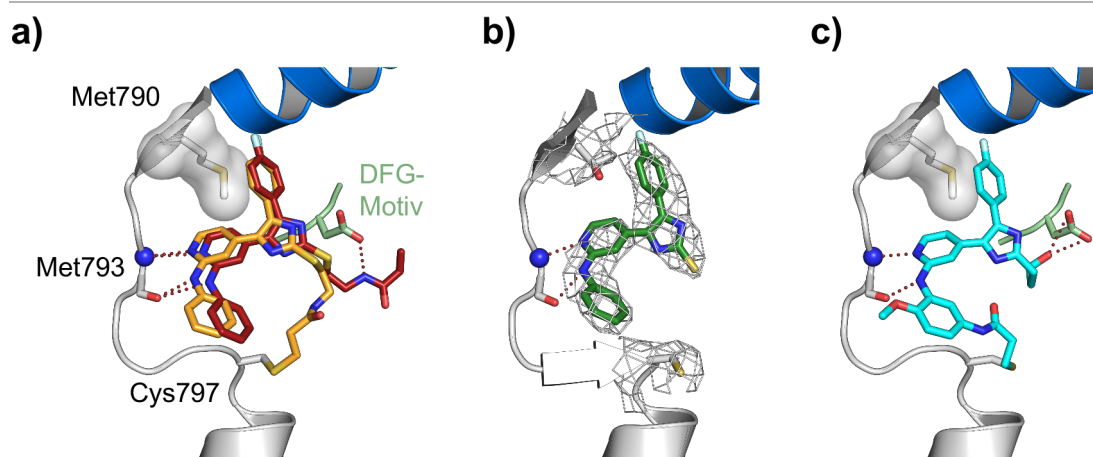
<sup>#</sup> Synthese der Verbindungen und Durchführung des Dockings durch M. Günther, M. Juchum (AG S. Laufer, Eberhard Karls Universität Tübingen)

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

<sup>\*\*</sup> Biochemische Charakterisierung der Mutante EGFR-L858R/T790M/C797S und Messung der Bindungskinetik durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

von 1,3  $\mu\text{M}$  gegenüber EGFR-L858R/T790M bestimmt und verdeutlicht, dass das Amin eine entscheidende Rolle für potente Besetzung der Bindetasche spielt. Die hohe Flexibilität der Alkyl-Kette wurde auch deutlich bei Kristallisationsstudien der Verbindung **11f** im Komplex mit EGFR-WT, wobei keine Elektronendichte für diese Kette nachgewiesen werden konnte (Abbildung 15b).<sup>⊥</sup>



**Abbildung 15.** Angenommener Bindungsmodus von Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren. **a)** kovalentes Docking (gelb), verglichen mit induced-fit Docking (rot) der Verbindung **11f**. **b)** Kristallstruktur-Analyse der Verbindung **11f** im Komplex mit EGFR-WT. **c)** kovalentes Docking der Verbindung **13i**.

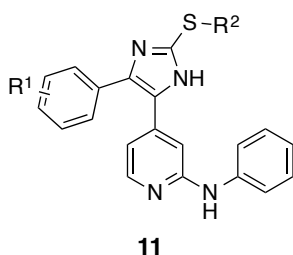
Die biochemische Evaluation der Verbindungen **11i–11k** zeigte, dass eine Einführung von sterisch anspruchsvollen Gruppen am Fluorophenyl-Substituenten nicht toleriert ist (**11j**). Für Verbindung **11k** mit einem *N,N*-Dimethylaminocrotonamid als Elektrophil wurde zwar biochemisch eine leicht erhöhte Potenz (EGFR-L858R/T790M  $\text{IC}_{50}$  = 18 nM) festgestellt, jedoch wurde vergleichsweise hohe Aktivität auf der EGFR-WT Zelllinie A431 nachgewiesen. Charakterisierung der Verbindungen **11l–11m** zeigt, dass ein propyl-Linker mit terminalem Amin oder Acrylamid deutlich weniger geeignet ist um potente Inhibition des Wirkstoff-resistenten EGFR zu erreichen, da hier  $\text{IC}_{50}$ -Werte über 240 nM gemessen wurden. Verbindungen **11n–11p** wurden mit weniger flexiblen Elektrophilen synthetisiert, jedoch konnte für die potenteste Verbindung **11o** ein  $\text{IC}_{50}$  von nur 66 nM bestimmt werden.

Aus der Serie an Verbindungen **11a–11p** wurde im zellulären Kontext der H1975 Linie die höchste Potenz für Verbindung **11f** festgestellt, mit einem  $\text{EC}_{50}$  von 2,4  $\mu\text{M}$ . Im Weiteren ist festzustellen, dass die Verbindungen dieser Serie eine hohe Wild-Typ-Inhibition aufweisen, mit teilweise bis zu 10-fach niedrigeren  $\text{IC}_{50}$ -Werten, verglichen mit Türsteher-mutiertem EGFR. Vermutlich ist der sterisch

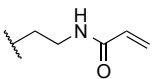
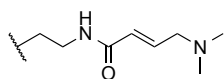
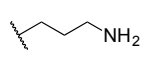
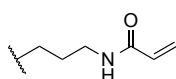
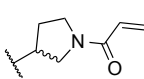
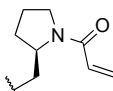
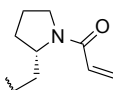
<sup>⊥</sup> Lösen der Kristallstrukturen in EGFR-WT durch: I. Landel im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit<sup>[141]</sup>

anspruchsvolle Fluorophenyl-Substituent teilweise in räumlichem Konflikt mit der Methionin-Türsteher-Seitenkette, was auch durch eine höhere Bindungsaffinität der Verbindung **11f** gegenüber EGFR-WT im Vergleich zu T790M ( $K_i = 1,6$  bzw.  $6,0$  nM) untermauert wird (Tabelle 13).

**Tabelle 10.** Biochemische und zelluläre Evaluation des ersten Sets von Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren.



Cpd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
			WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
<b>11a</b>	4-F-		24 ± 3 2,5 ± 0,3 130 ± 25	11000 ± 3500 22000 ± 6400
<b>11b</b>	4-F-		183 ± 160 75 ± 57 1200 ± 190	10000 ± 1200 15000 ± 1500
<b>11c</b>	4-F-		9,0 ± 2,4 1,0 ± 0,1 81 ± 8	18000 ± 9600 16000 ± 4500
<b>11d</b>	4-F-		11 ± 3 1,1 ± 0,1 83 ± 3	11000 ± 4200 16000 ± 5300
<b>11e</b>	4-F-		4,8 ± 0,7 2,6 ± 1,1 29 ± 12	11000 ± 800 7200 ± 1100
<b>11f</b>	4-F-		1,6 ± 0,5 2,2 ± 0,6 38 ± 10	12000 ± 5200 2400 ± 730
<b>11g</b>	4-F-		33 ± 13 3,2 ± 2,3 52 ± 26	16000 ± 6600 9700 ± 1100
<b>11h</b>	4-F-		185 ± 138 76 ± 41 1300 ± 890	12000 ± 3500 14000 ± 3400
<b>11i</b>	H		12 ± 5 1,7 ± 0,9 29 ± 6	11000 ± 4800 3100 ± 1900

Cpd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
			WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
11j	3-CF <sub>3</sub> -4-F-		45 ± 37 144 ± 52 646 ± 50	11000 ± 3600 3100 ± 200
11k	4-F-		2,7 ± 1,0 1,9 ± 1,2 18 ± 2	6600 ± 1900 5100 ± 1100
11l	4-F-		55 ± 35 12 ± 11 240 ± 104	7400 ± 210 8400 ± 2600
11m	4-F-		16 ± 3 22 ± 4 321 ± 35	1400 ± 230 1300 ± 200
11n	4-F-		28 ± 3 3,1 ± 0,9 76 ± 12	6900 ± 2000 3400 ± 350
11o	4-F-		19 ± 5 1,9 ± 0,4 66 ± 14	8800 ± 2600 4700 ± 840
11p	4-F-		217 ± 58 25 ± 5 417 ± 167	17000 ± 4600 14000 ± 680

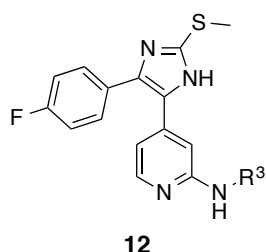
In der Bestrebung, ein Elektrophil mit verringerter Flexibilität zu erhalten, wurde eine Serie an Verbindungen **12a–12h** getestet und im Folgenden analysiert (Tabelle 11). Dabei wurde das Acrylamid in *meta*-Stellung des Anilin-Restes positioniert. Verbindung **12a**, welche einen Methylen-Linker aufweist, zeigt einen schwachen Effekt auf die Kinase-Aktivität des EGFR-L858R/T790M mit einem IC<sub>50</sub> von 89 nM, während **12b** mit direkt verknüpftem Acrylamid eine hohe Potenz zeigt, mit einem IC<sub>50</sub> von 3,3 nM. Die hohe inhibitorische Potenz der Verbindung **12b** zeigt sich ebenfalls in den entsprechenden H1975 Zellen mit einem EC<sub>50</sub> von 186 nM und der Vergleich zur reversiblen Verbindung **12c** verdeutlicht den ausgeprägten kovalenten Charakter, da hier ein biochemischer halb-maximaler Effekt von nur 93 nM gegenüber Türsteher-mutiertem EGFR bestimmt wurde. Die Einführung einer Methoxy-Gruppe in *para*-Stellung zum Acrylamid resultierte in Verbindung **12d**, welche sehr potent im biochemischen Assay mit sub-nanomolarer Inhibition vermessen wurde. Verbindung **12d** zeigte ebenfalls einen sehr ausgeprägten Effekt auf EGFR-mutierte H1975 Zellen mit eine EC<sub>50</sub> von unter 14 nM. Auch wenn EGFR Wild-Typ A431 Zellen nur schwach beeinträchtigt wurden, bei effektiven Konzentrationen über 4 μM, ist nicht davon auszugehen



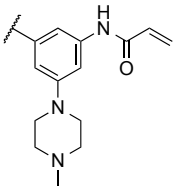
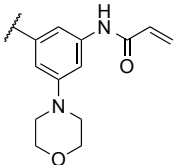
dass hier eine hohe Selektivität vorliegt, da die Verbindungs-Klasse mit diesem Substitutionsmuster vermutlich einen sterischen Konflikt mit der Methionin-Türsteher-Seitenkette aufweist. Eine Analyse der Bindungskinetik von **12d** zeigte den Affinitätsverlust gegenüber T790M-mutiertem EGFR. Eine erhöhte Rate der kovalenten Bindungs-Bildung ( $k_{\text{inact}} = 0,16 \text{ min}^{-1}$ ) zeigte hingegen eine erfolgreich reduzierte Flexibilität der Reaktionspartner, welche zu einer effizienteren Alkylierung führte (Tabelle 13).

Verbindungen **12f–12h** zielten auf eine erhöhte Löslichkeit und verbesserte Zellgängigkeit ab, jedoch zeigten diese äquipotente Inhibition beider Zelllinien bei  $\text{EC}_{50}$ -Werten über  $1 \mu\text{M}$ .

**Tabelle 11.** Biochemische und zelluläre Evaluation des zweiten Sets von Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren.



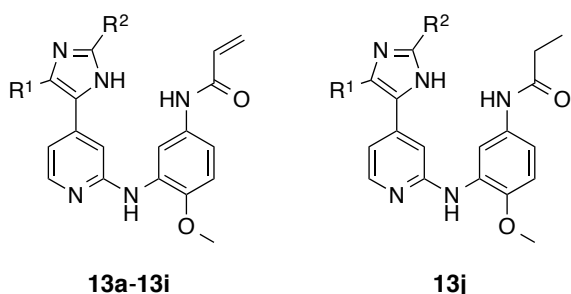
Cpd	$\text{R}^3$	EGFR HTRF $\text{IC}_{50} [\text{nM}]$	EGFR CTG $\text{EC}_{50} [\text{nM}]$
		WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
<b>12a</b>		$16 \pm 8$ $4,9 \pm 2,0$ $89 \pm 32$	$14000 \pm 6300$ $5400 \pm 1500$
<b>12b</b>		$<1$ $<1$ $3,3 \pm 1,5$	$1700 \pm 390$ $186 \pm 37$
<b>12c</b>		$22 \pm 11$ $6,8 \pm 7,8$ $93 \pm 37$	$1500 \pm 690$ $2200 \pm 470$
<b>12d</b>		$<1$ $<1$ $<1$	$4100 \pm 2800$ $<14$
<b>12e</b>		$<1$ $<1$ $5,0 \pm 0,9$	$7700 \pm 4900$ $4300 \pm 1400$
<b>12f</b>		$<1$ $<1$ $3,1 \pm 0,5$	$1700 \pm 160$ $1500 \pm 390$

Cpd	R <sup>3</sup>	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
12g		<1 <1 <1	1400 ± 690 1100 ± 160
12h		<1 <1 <1	1500 ± 610 1300 ± 110







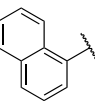



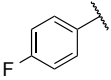
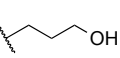
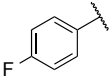
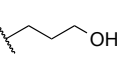
Nachdem deutlich wurde, dass die Fluorophenyl-Gruppe vermutlich sterische Abstoßung mit der Methionin Türsteher-Seitenkette verursacht, wurde eine Serie von Verbindungen **13a–13h** getestet (Tabelle 12). Diese weisen unterschiedlich räumlich anspruchsvolle Substituenten des Imidazol-Rings auf und erlauben so weitere Einblicke in die Kompatibilität von Substituenten an dieser Position. Verbindung **13a** weist dabei keine Substitution des Imidazols auf und zeigt im biochemischen Assay eine deutliche Selektivität für die T790M-mutierte EGFR-Variante (IC<sub>50</sub> = 8,6 nM) gegenüber Wild-Typ (IC<sub>50</sub> = 17 nM). Auch wenn diese Verbindung deutliche Einbußen in ihrer zellulären Potenz gegenüber H1975 aufweist (EC<sub>50</sub> = 2 µM), konnte so nachgewiesen werden, dass die schlechte Selektivität der Verbindungen dieser Serie durch Abstoßung mit Substituenten dieser Position mit der sperrigen Methionin-Seitenkette bewirkt wird. Im Weiteren wurde Verbindung **13b** getestet, welche mit einer Methyl-Gruppe substituiert ist und auf biochemischer Ebene wurden vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte bei 32 nM gegenüber Wild-Typ und T790M-Mutante bestimmt. Sterisch sehr anspruchsvolle Gruppen, wie eine *iso*-Butyl-Gruppe in Verbindung **13c** führten zu einer deutlich verschlechterten Potenz gegenüber EGFR-L858R/T790M (IC<sub>50</sub> = 485 nM), während Carbo-Zyklische Verbindungen **13d–13f** hohe inhibitorische Aktivitäten mit IC<sub>50</sub>-Werten im nanomolaren Bereich erzielten. Hierbei wurde eine hohe Inhibition des Wild-Typs festgestellt mit teilweise sub-nanomolaren Aktivitäten und es wird deutlich, dass sich Substituenten an dieser Position die größer als eine Methyl-Gruppe sind negativ auf die Selektivität auswirken. Aromatische Substituenten, wie 1-Naphthyl und Thiophen der Verbindungen **13g** und **13h** bewirkten eine hohe Potenz auf biochemischem Level, zeigten aber auch Aktivität gegenüber EGFR-mutierten H1975 Zellen mit EC<sub>50</sub>-Werten von 376 bzw. 84 nM.

Abschließend wurde Verbindung **13i** und das reversible Gegenstück **13j** getestet, welche sowohl einen Fluorophenyl-Substituenten aufweisen, welcher in Verbindung **12d** die höchste zelluläre Aktivität in H1975 Zellen bewirkte, sowie eine Alkyl-Kette mit terminalem Alkohol, welche vermutlich eine polare Interaktion mit Asp855 ausbilden kann (Abbildung 15c) und daher vermutlich eine hohe Bindungsaffinität aufweist. Für beide Verbindungen wurden sub-nanomolare  $IC_{50}$ -Werte gegenüber allen getesteten EGFR-Varianten erhalten, wobei die hohe Potenz der reversiblen Verbindung **13j** einen ersten Hinweis für eine hohe reversible Affinität dieser Verbindungen darstellt. Eine detaillierte Charakterisierung der Bindungseigenschaften bestätigte die hohe Affinität mit einem  $K_i$  von 0,10 nM gegenüber Wirkstoff-resistentem EGFR. Diese wurde durch die Einführung der Alkylalkohol-Gruppe bewirkt, wie der Vergleich zu Verbindung **12d** zeigte, welche einen  $K_i$  von 1,2 nM aufwies. Vermutlich sind die Alkohol-Gruppen jedoch nicht gut Zellgängig, wie moderate  $EC_{50}$ -Werte von über 400 nM implizieren. Diese ist vermutlich auf die Ionisierbarkeit der Hydroxyl-Gruppe zurückzuführen, da geladene Moleküle die Zellmembran nur schlecht passieren können.

**Tabelle 12.** Biochemische und zelluläre Evaluation des dritten Sets von Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren.



Cpd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
			WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
<b>13a</b>	H	-S-	17 ± 3 5,6 ± 0,9 8,6 ± 1,1	4100 ± 1000 2000 ± 450
<b>13b</b>	Me	-S-	32 ± 3 10 ± 2 33 ± 5	9700 ± 2600 4100 ± 760
<b>13c</b>		-S-	57 ± 4 16 ± 5 485 ± 47	20000 ± 6800 18000 ± 7800

Cpd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
			WT L858R L858R/T790M	A431 H1975
<b>13d</b>			2,3 ± 0,3 <1 7,4 ± 0,9	8000 ± 1000 2300 ± 290
<b>13e</b>			<1 <1 6,8 ± 0,6	8900 ± 1600 2000 ± 220
<b>13f</b>			<1 <1 4,5 ± 0,5	7800 ± 2800 1400 ± 530
<b>13g</b>			<1 <1 1,1 ± 0,0	3000 ± 2000 376 ± 149
<b>13h</b>			<1 <1 <1	7400 ± 1100 84 ± 8
<b>13i</b>			<1 <1 <1	4000 ± 2900 398 ± 171
<b>13j</b>			<1 <1 <1	17000 ± 3800 7200 ± 2100

Wie die oben diskutierten Arbeiten von Engel und Becker, *et al.* zeigten, ist eine hohe reversible Bindungsaffinität von Inhibitoren des EGFR-L858R/T790M eine Voraussetzung für die potente Inhibition der C797S-mutierten EGFR-Variante.<sup>[130]</sup> Da die Verbindungen dieser Serie einen sehr hohen reversiblen Anteil aufweisen, wurden einige ausgewählte Verbindungen **12d** und **13i** auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der multi-Wirkstoff-resistenten Mutante getestet (Tabelle 13). Insbesondere die optimierte Verbindung **13i** zeigte einen IC<sub>50</sub> von 8 nM und stellt damit einen der ersten beschriebenen biochemisch hoch-potenten Inhibitor der C797S-mutierten EGFR-Variante dar.

**Tabelle 13.** Analyse der Bindungskinetik von Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren.

Cpd	EGFR	HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	K <sub>i</sub> [nM]	k <sub>inact</sub> [min <sup>-1</sup> ]	k <sub>inact</sub> /K <sub>i</sub> [μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>11f</b>	WT	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,04	0,09 ± 0,004	0,94 ± 0,06
	L8585R	2,2 ± 0,6	0,38 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,58 ± 0,02
	L858R/T790M	38 ± 10	6,0 ± 0,8	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,00
	L858R/T790M/C797S	n.b.	-	-	-
<b>12d</b>	WT	<1	0,35 ± 0,01	0,16 ± 0,05	2,79 ± 0,82
	L8585R	<1	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,01	1,83 ± 0,91
	L858R/T790M	<1	1,2 ± 0,5	0,16 ± 0,07	2,18 ± 0,58
	L858R/T790M/C797S	90 <sup>a</sup>	-	-	-
<b>13i</b>	WT	<1	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,06	15 ± 4
	L8585R	<1	0,03 ± 0,003	0,10 ± 0,03	13 ± 3
	L858R/T790M	<1	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,003	11 ± 2
	L858R/T790M/C797S	8 <sup>a</sup>	-	-	-

<sup>a</sup>Einfachbestimmung, durchgeführt bei Reaction Biology; n.b. = nicht bestimmt.

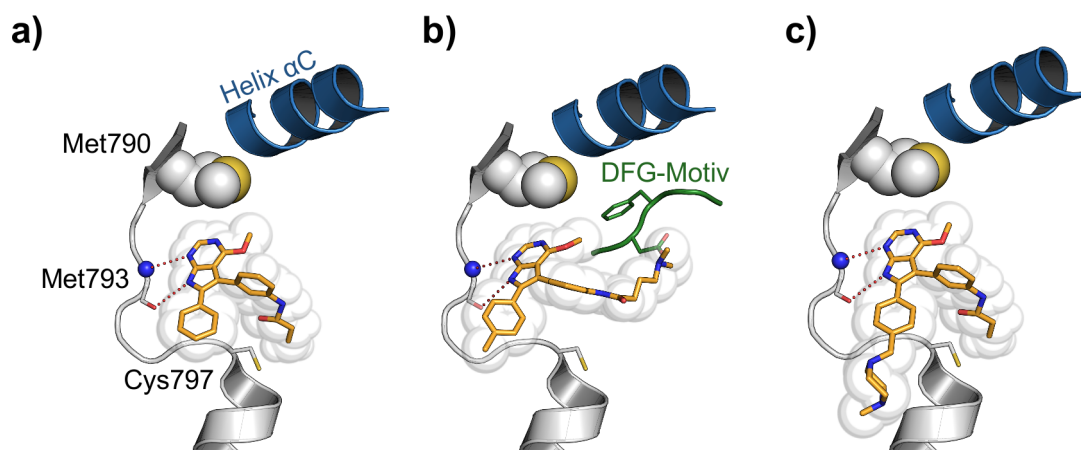
Zusammenfassend wurden in dieser Serie an Verbindungen die bisher gewonnenen Erkenntnisse gut umgesetzt. Eine Optimierung der Flexibilität und Ausrichtung des Elektrophils in Nähe des reaktiven Cys797 lieferte potente Inhibitoren des EGFR-L858R/T790M, sowohl biochemisch, wie auch im zellulären Kontext. Durch einen optimierten reversiblen Charakter der Protein–Inhibitor-Bindung konnte zudem eine sehr potente Inhibition der mutierten Variante EGFR-L858R/T790M/C797S auf der biochemischen Ebene erreicht werden. Um jedoch Inhibitoren der vierten Generation zu entwickeln, wäre die Bioaktivität dieser Verbindungen in einem zellulären System mit C797S-Mutation zu zeigen. Außerdem zeigen die hier entwickelten Inhibitoren keine Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR. Die durch das *Target-Hopping* von p38 Inhibitoren resultierende Fluorophenyl-Gruppe kommt in sterischen Konflikt mit der Methionin-Seitenkette, wie die diskutierten Daten der SAR gezeigt haben. Dennoch wurde hier eine interessante Verbindungs-Klasse vorgestellt und weitere Optimierung ausgehend von dem selektiven Inhibitor **13a** könnte vielversprechende Inhibitor-Kandidaten der vierten Generation liefern.

### 3.2.4. Selektive TKIs erhalten durch Mitsunobu-basierte Derivatisierung und Einblicke in deren Bindungscharakteristiken

In der Bestrebung weitere Grundgerüste als EGFR TKIs zu etablieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das 7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst untersucht. Basierend auf dieser Grundstruktur sind bereits Inhibitoren des EGFR beschrieben worden, darunter der EGFR/VEGFR-dual-Inhibitor AEE788.<sup>[99,100,117]</sup> Jedoch wurden diese hier als T790M-Mutanten-selektive und kovalente Inhibitoren weiterentwickelt. Analyse der Bindemodi bekannter Strukturen zeigte, dass die Wahl von Substituenten in 4-Position vermutlich maßgeblich für die Kompatibilität mit der Methionin-Seitenkette ist und damit die Selektivität über Wild-Typ beeinflusst (PDB IDs: 2J6M, 2JIU). Erste Inhibitoren wurden daher mit einem sterisch wenig anspruchsvollen Methyl-Ether entworfen. Die 5-Position eignete sich basierend auf dem angenommenen Bindemodus zur Einführung eines Phenyl-Acrylamid, welches so vermutlich in räumliche Nähe zum nukleophilen Cys797 gebracht werden kann. Ein Phenyl-Substituent in 6-Position wurde als essentiell für die korrekte Orientierung des Grundgerüsts angenommen, da dieses so zwei Wasserstoff-Brückenbindungen zu Met793 der Scharnier-Region ausbilden kann (Abbildung 16a). In Vorarbeiten wurde eine Syntheseroute etabliert und ein erstes Set an Verbindungen synthetisiert (Anhang, Schema A1).<sup>Δ</sup> Dabei wurde ausgehend von 6-Brom-4-Chlor-7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**14**) in einer Nukleophilen Substitution ( $S_NAr$ ) zunächst die Methoxy-Gruppe in 4-Position eingeführt und anschließend das Pyrrol-Amin mit der SEM-Schutzgruppe ([2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl) versehen, resultierend in Verbindung **16**. Die Phenyl-Gruppe in 6-Position wurde durch Suzuki-Kupplung eingeführt, sowie der Nitrophenyl-Linker in 5-Position, nachdem diese mit NIS (*N*-Iodosuccinimid) iodiert wurde. Reduktion der so erhaltenen Verbindung **19** mit Ammoniumformiat und Palladium auf Aktivkohle resultierte in dem Amin **20**. Das Acrylamid wurde anschließend in einer Schotten-Baumann-Reaktion eingeführt, gefolgt von saurer Entschützung des Pyrrols, wodurch die finale Verbindung **21a** erhalten werden konnte. Analog wurde das reversible Gegenstück **21b** mit Propionsäurechlorid als Substrat synthetisiert. Biochemische Charakterisierung zeigte eine akzeptable Aktivität für **21a** gegenüber EGFR-L858R/T790M mit einem  $IC_{50}$  von 176 nM und wies dabei fast 10-fache Selektivität gegenüber Wild-Typ auf (Tabelle 14).<sup>†</sup> Der Vergleich zur reversiblen Verbindung legt einen kovalenten Modus der Verbindung nahe. Hier wurde ein  $IC_{50}$  von fast 4  $\mu$ M bestimmt.

<sup>Δ</sup> Synthese der Verbindungen durch: J. Lategahn im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[101]</sup>

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)



**Abbildung 16.** Angenommener Bindungsmodus von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren **21a**, **28b** und **30a** (Modell basierend auf PDB IDs: 2JIU, 3UG1, 4JRV).

Da Verbindung **21a** nur schwache zelluläre Aktivität von 12  $\mu\text{M}$  in H1975 Zellen zeigte,<sup>‡</sup> wurden Löslichkeits-vermittelnde Gruppen eingeführt und die Syntheseroute weiter optimiert (Anhang, Schema A2).<sup>¶</sup> Dazu wurde 4-Chlor-7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**22**) mit NIS iodiert und mit der SEM-Gruppe geschützt, bevor der Methylether etabliert wurde. Die resultierende Verbindung **24** wurde dann mit Nitrophenylboronsäure in einer Suzuki-Kupplung umgesetzt, anschließend in 6-Position bromiert, wodurch hier eine 1-Benzyl-4-methylpiperazin-Gruppe eingeführt werden konnte. Unter harschen reduktiven Bedingungen wurde die Methylpiperazin-Gruppe der Verbindung **26** in benzylicher Position abgespalten, sowie die Nitro-Gruppe zum Amin **27** reduziert. Dieses wurde weiter umgesetzt zu Verbindungen **28** mit sekundären Aminen verknüpft mit dem Acrylamid. Unter weniger harschen Bedingungen konnte Verbindung **26** jedoch auch zum Amin **29** umgesetzt werden, bei welchem die Piperazin-Einheit intakt blieb. So konnte die finale Verbindung **30a** und die reversible Verbindung **30b** erhalten werden.

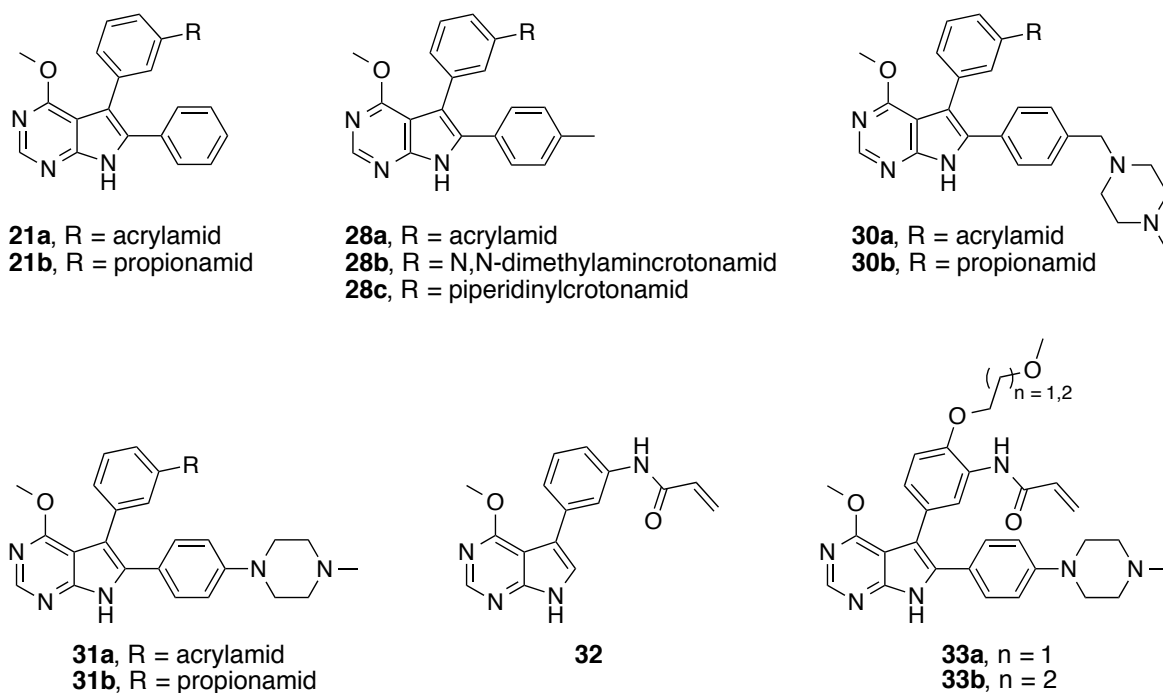
Biochemische Analyse zeigte einen deutlichen Gewinn an inhibitorischer Potenz für Verbindung **28b** mit *N,N*-Dimethylaminocrotonamid als Michael-Akzeptor, welche einen  $\text{IC}_{50}$  von 26 nM gegenüber doppelt mutiertem EGFR aufwies. Ebenso konnte ein erhöhter Effekt auf H1975 Lungenkrebs-Zellen nachgewiesen werden, mit einem  $\text{EC}_{50}$  unter 1  $\mu\text{M}$ . Interessanterweise wurde für Verbindung **28c**, welche ein terminales Piperidin am Michael-Akzeptor aufwies, ein Verlust an Aktivität festgestellt (EGFR-L858R/T790M  $\text{IC}_{50}$  = 158 nM). Es lässt sich vermuten,

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien HCC827, H358 & A549 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

<sup>¶</sup> Synthese der Verbindungen durch: M. Flaßhoff im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit<sup>[142]</sup> und P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[143]</sup>

dass das sekundäre Amin eine polare Interaktion mit Asp855 des DFG-Motifs ausbildet (Abbildung 16b), die bereits für ähnlichen Verbindungen beschrieben wurde (PDB ID: 4JRV).<sup>[144]</sup> Diese Orientierung würde keine kovalente Bindungsbildung mit Cys797 erlauben und der Effekt könnte für die basischere Piperidin-Gruppe der Verbindung **28c** stärker ausgeprägt sein.

**Tabelle 14.** Biochemische und zelluläre Evaluation des ersten Sets von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.



Cpd	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>21a</b>	1200 ± 90 133 ± 57 176 ± 33	>30000 827 ± 234 12000 ± 1200	>30000 >30000
<b>21b</b>	5400 ± 1900 1700 ± 750 4000 ± 610	>30000 19000 ± 2500 >30000	>30000 >30000
<b>28a</b>	200 ± 148 93 ± 54 175 ± 44	9900 ± 4200 151 ± 10 2000 ± 90	14000 ± 680 10000 ± 500
<b>28b</b>	60 ± 18 34 ± 11 26 ± 8	2400 ± 990 282 ± 29 980 ± 136	11000 ± 3500 7100 ± 3200

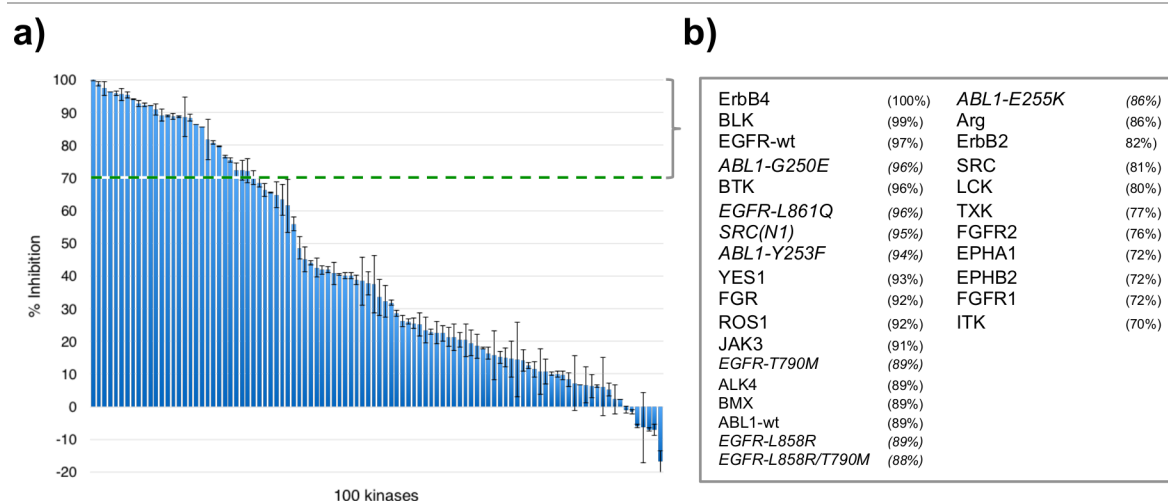


Cpd	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>28c</b>	220 ± 57	2700 ± 1200	4300 ± 340
	197 ± 11	253 ± 1	4500 ± 900
	158 ± 16	1900 ± 270	
<b>30a</b>	15 ± 10	768 ± 271	2900 ± 1500
	2,3 ± 0,4	<14	2500 ± 1600
	4,0 ± 1,7	137 ± 51	
<b>30b</b>	460 ± 162	5700 ± 60	10000 ± 2200
	116 ± 57	1500 ± 400	5700 ± 1400
	302 ± 84	9600 ± 1100	
<b>31a</b>	0,4 ± 0,0	638 ± 247	1700 ± 720
	0,1 ± 0,0	<14	840 ± 289
	0,2 ± 0,0	60 ± 8	
<b>31b</b>	996 ± 395	9700 ± 4000	10000 ± 2200
	147 ± 97	1800 ± 730	6300 ± 1100
	305 ± 192	14000 ± 1800	
<b>32</b>	82 ± 4	14000 ± 4700	24000 ± 4900
	14 ± 2	2200 ± 970	14000 ± 1400
	31 ± 4	9900 ± 3400	
<b>33a</b>	0,2 ± 0,1	27000 ± 5100	1100 ± 230
	<0,1	<14	956 ± 75
	<0,1	298 ± 251	
<b>33b</b>	0,2 ± 0,2	1300 ± 780	4500 ± 3100
	<0,1	<14	5900 ± 3700
	0,1 ± 0,1	375 ± 252	

Verbindung **30a**, welche eine Methyloperazin-Gruppe verknüpft mit dem 6-Phenyl-Substituenten aufweist, zeigte im Kontext von Türsteher-mutiertem EGFR eine sehr hohe inhibitorische Potenz mit einem biochemischen IC<sub>50</sub> von 4,0 nM und einem zellulären EC<sub>50</sub> von 137 nM. In HCC827 Zellen, welche die aktivierende EGFR-Mutation delE746\_A750 im Rezeptor aufweisen, wurde ein inhibitorischer Effekt von unter 14 nM nachgewiesen. Analyse der Aktivierung der EGFR-Signalkaskade durch Phosphorylierung mittels Western Blot zeigte in H1975 Zellen einen inhibitorischen Effekt zwischen 10 und 100 nM, in guter Übereinstimmung mit dem Effekt auf die Zell-Viabilität (Abbildung 21 und Anhang, Abbildung A4).<sup>§</sup> Aufgrund der positiven Ergebnisse für Verbindung **30a**, wurde die Selektivität innerhalb einer Auswahl von 100 Kinasen getestet (Abbildung 17). Bei

<sup>§</sup> Western-Blot-Analysen durch: J. Ketzer, T. Mühlenberg (AG S. Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen)

einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte der Inhibitor einen inhibitorischen Effekt von 70% oder höher in 21 Kinasen und acht mutierten Varianten davon. Darunter sind auch die neun getesteten Kinasen, welche ein reaktives Cystein in einer analogen Position zu Cys797 in EGFR aufweisen. Hier resultiert die hohe Inhibition der Kinase-Aktivität vermutlich aus dem kovalenten Bindungsmodus. Im Weiteren wurden Verbindungen **31** synthetisiert, bei welcher eine Methylpiperazin-Gruppe ohne Methylen-Linker direkt an der 6-Phenyl-Gruppe positioniert wurde. Biochemische Charakterisierung der Verbindung **31a** zeigte sub-nanomolare Inhibition der getesteten EGFR-Varianten und bemerkenswerte  $\text{EC}_{50}$ -Werte von 60 nM in H1975 und <14 nM in HCC827 Krebszellen. Für die reversiblen Analoga **30b** und **31b** wurde jeweils ein deutlich geringerer Effekt auf die EGFR-Kinasen bzw. entsprechenden Zellen festgestellt und indiziert den kovalenten Bindemodus dieser Verbindungen (Tabelle 14).



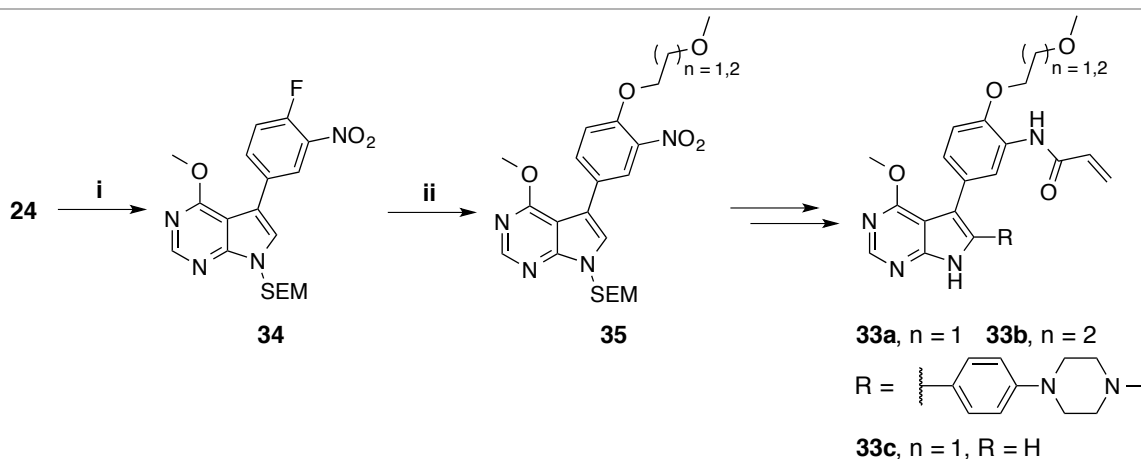
**Abbildung 17.** Kinase Selektivitäts-Profilierung von Verbindung **31h** bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  generiert mittels SelectScreen Profiling Service von Life Technologies. **a)** Illustration als Wasserfall-Plot. **b)** Auflistung der Kinasen mit  $\geq 70\%$  Inhibition.

Abbildung 16c zeigt einen möglichen Bindungsmodus der Verbindung **30a** in EGFR. Um weitere Einblicke in die Bindung der Pyrrolopyrimidine in der aktiven Tasche der Kinase-Domäne zu erhalten, wurden Kristallisationsstudien durchgeführt. Dazu wurde die mutierte Kinase cSrc-T338M/S345C als Modellsystem verwendet,<sup>[26,137]</sup> da Kristalle mit EGFR-T790M keine Aufnahme von Diffraktions-Daten ermöglichten.\*\* Verbindung **32** wurde basierend auf der etablierten Route synthetisiert,## um die Rolle des 6-Phenyl-Substituenten als Anker für die korrekte Orientierung des Inhibitors zu untersuchen. Im Komplex mit

\*\* Lösen der Kristallstrukturen in cSrc durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

## Synthese der Verbindung durch: T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[145]</sup>

mutiertem cSrc bildete der *N*3-Stickstoff des Grundgerüstes einen H-Brücken-Kontakt zu Met341 der Scharnier-Region aus, während das Acrylamid kovalent an Cys345 gebunden vorlag, wie eine deutliche Elektronen-Dichte zeigte (Abbildung 18a). Die Verbindungen **33** wurden in der Bestrebung, mit Glykol-Ketten reversible Interaktionen mit der Glycin-reichen Schleife auszubilden, synthetisiert (Schema 1).<sup>11</sup>

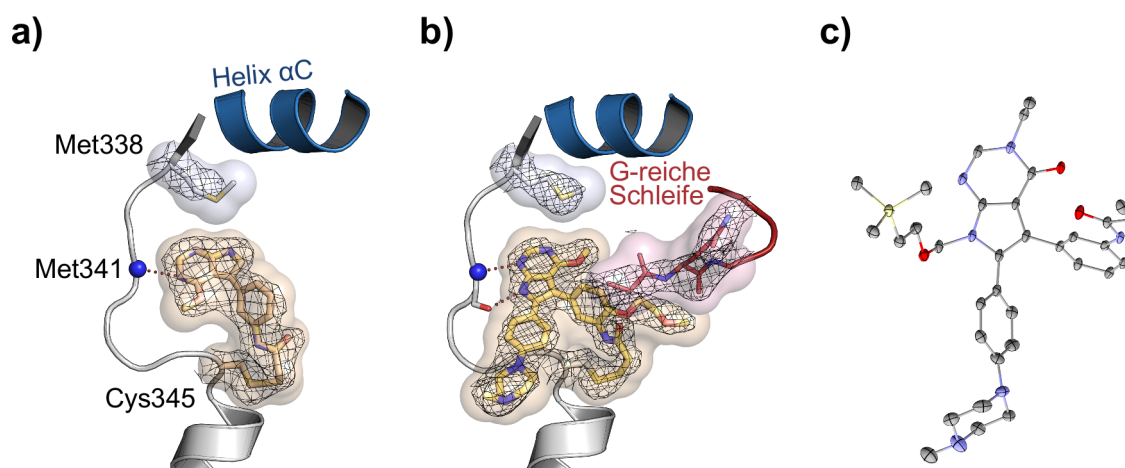


**Schema 1.** Synthese von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit Glykol-Substituenten. Reaktionsbedingungen: **(i)** (4-Fluor-3-nitrophenyl)boronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1), 80 °C, 86%; **(ii)** 2-Methoxyethan-1-ol oder 3-Methoxypropan-1-ol, NaH, THF, 0 °C → RT, 71-73%.

Eine Co-Kristallstruktur zeigte den angenommenen Bindemodus für **33a**, in welchem Met341 durch H-Brücken mit *N*1 und Pyrrol-NH des Grundgerüstes gebunden wird, eine kovalente Bindung zum reaktiven Cystein nachgewiesen werden konnte, und die Glykol-Kette nahe der G-reichen Schleife lokalisiert ist, wie angenommen (Abbildung 18b).<sup>\*\*</sup> Diese Interaktion könnte die hohe biochemische Potenz der Verbindungen **33** erklären, jedoch sind diese Glykol-Reste nicht kompatibel mit zellulärer Inhibition. Zusammenfassend wird deutlich, dass der Phenyl-Substituent in 6-Position eine entscheidende Rolle bei der Orientierung des Liganden in der aktiven Tasche spielt.

<sup>11</sup> Synthese der Verbindungen durch: L. Hodson (AG W. van Otterlo, Universität Stellenbosch, Südafrika) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>\*\*</sup> Lösen der Kristallstrukturen in cSrc durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)



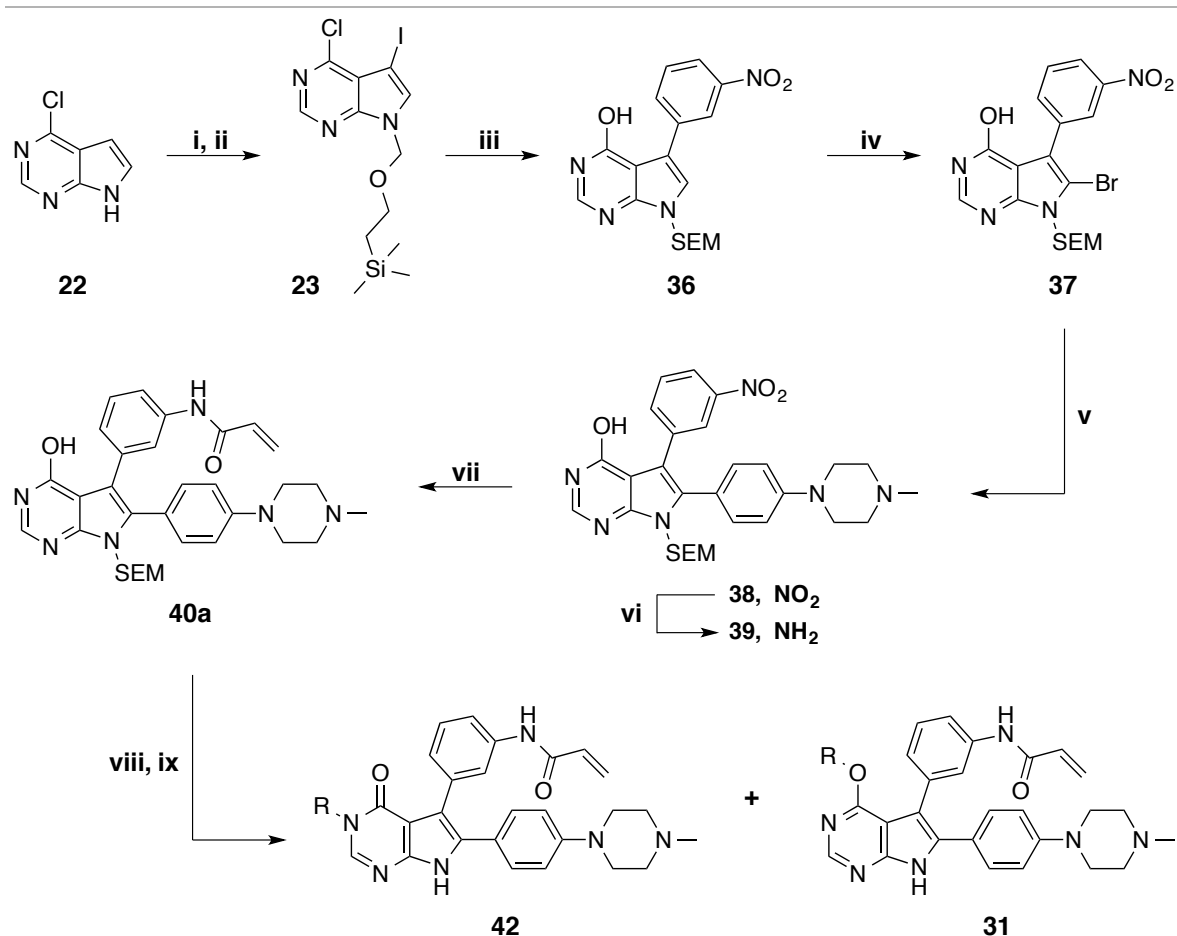
**Abbildung 18.** a)–b) Kristallstruktur-Analyse der Verbindung **32** und **33a** im Komplex mit cSrc-T338M/S345C als Modellsystem für EGFR-T790M. c) Klein-Molekül Kristallstruktur der Verbindung **41a**.

Nach der erfolgreichen Optimierung der Pyrrolopyrimidin-basierten EGFR-Inhibitoren bezüglich ihrer kovalenten Bindung an Cys797, Selektivität, Löslichkeit und zellulären Potenz, wurden verschiedene Substituenten in räumlicher Nähe zur Türsteher-Seitenkette getestet. Es wurde eine entsprechende Syntheseroute etabliert (Schema 2),<sup>¶</sup> bei welcher in einem entscheidenden Schritt während der Suzuki-Kupplung von Verbindung **23** mit *meta*-Nitrophenylboronsäure unter harschen Reaktionsbedingungen in einem Mikrowellenreaktor ebenfalls der 4-Chlor-Substituent hydrolysiert wurde. Die resultierende Verbindung **36** konnte in vier Schritten zum Schlüssel-Intermediat **40a** umgesetzt werden. Dieses wurde als Substrat in einer Mitsunobu-Reaktion mit Ethanol umgesetzt, wobei LC/MS-Analyse der Reaktions-Mischung die Bildung zweier Produkte mit gleicher Masse aber unterschiedlicher Retentionszeit in der Chromatographie zeigte (Abbildung 19a). Trennung der Isomere gefolgt von Struktur-Aufklärung mittels NMR zeigte, dass das *N*3-substituierte Pyrrolopyrimidin-4-on, sowie das *O*4-substituierte Pyrrolopyrimidin gebildet wurden, die in dieser Reihenfolge von einer C18-Säule eluierten. Entscheidend war dabei das HMBC NMR-Experiment, welches die Kopplung von Protonen zu Kohlenstoff-Atomen über zwei und drei Bindungen zeigt (Abbildung 19b und Anhang, Abbildung A5). Die Ethyl-CH<sub>2</sub>-Gruppe (markiert in grün) kann im Fall der *N*-alkylierten Verbindung **41a** mit drei C-Atomen koppeln, während in der *O*-alkylierten Verbindung **41b** lediglich zwei Kopplungen (markiert in rot) möglich sind, was analog im Experiment beobachtet wurde.<sup>▽</sup> Zusätzlich konnte für die Verbindung **41a** eine klein-Molekül

<sup>¶</sup> Synthese durch: P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[143]</sup>

<sup>▽</sup> Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren durch: W. Hiller (NMR-Abteilung, TU Dortmund)

Kristallstruktur erhalten werden, die eine Alkylierung des N3-Stickstoff bestätigte (Abbildung 18c).<sup>ΔΔ</sup>



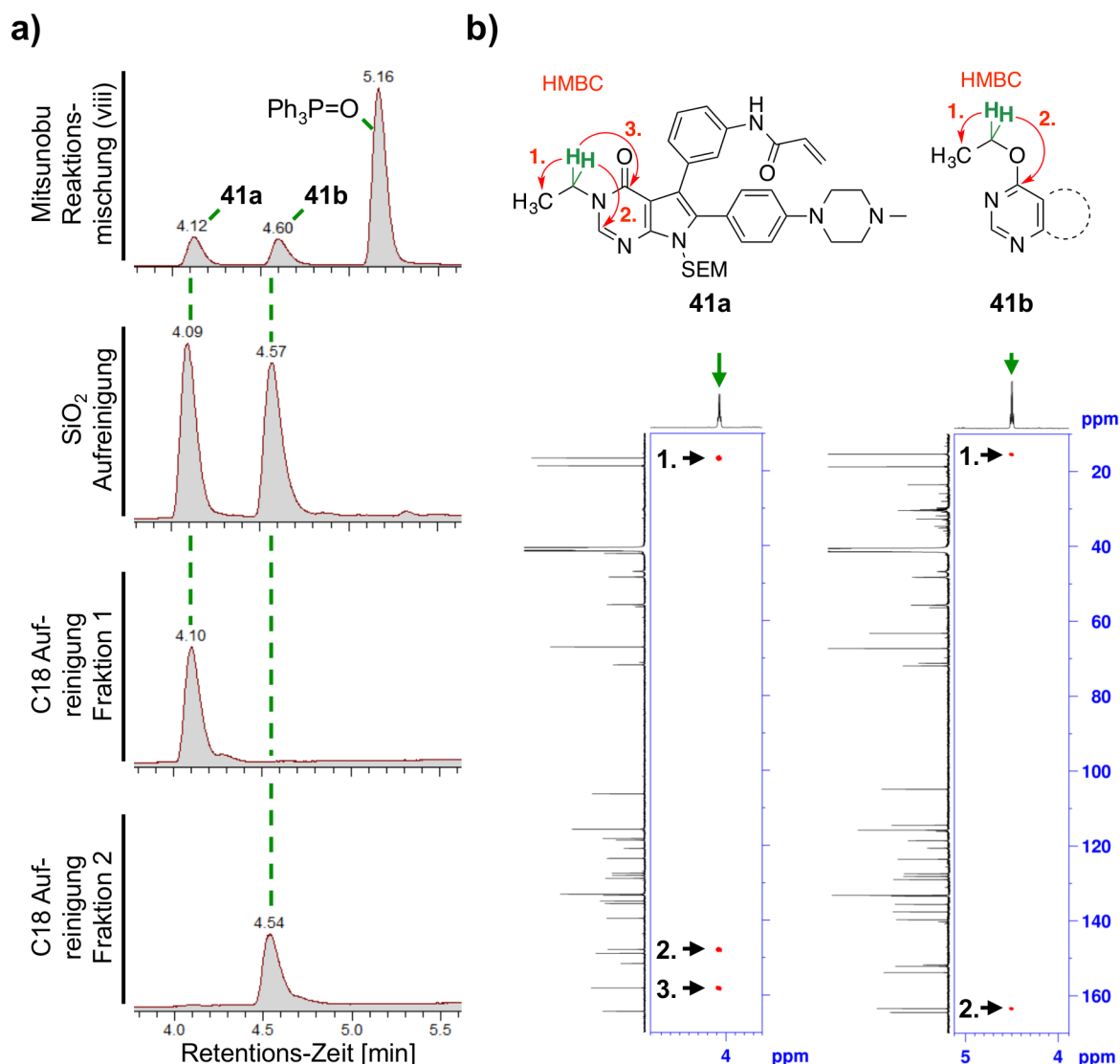
**Schema 2.** Synthese von Pyrrolopyrimidin-4-on- und Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren. Reaktionsbedingungen: **(i)** *N*-Iodosuccinimid, DMF, RT, 97%; **(ii)** SEM-Cl, NaH, THF, 0 °C, 71%; **(iii)** *meta*-Nitrophenylboronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN:H<sub>2</sub>O (2:1), 150 °C, 90 min,  $\mu$ w, 74%; **(iv)** *N*-Bromsuccinimid, MeCN, RT, quant.; **(v)** 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenylboronsäure Pinacolester, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME:H<sub>2</sub>O (5:1), 150 °C, 90 min,  $\mu$ w, 68%; **(vi)** Eisenpulver, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (4:1), Reflux, 94%; **(vii)** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 76%; **(viii)** ROH, DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF, 40 °C, 30 min, Ultraschallbehandlung; **(ix)** TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3), RT, dann NaOH:THF (1:1), RT, 4-79% über zwei Schritte.

Mit der so etablierten Syntheseroute wurde ein Set an *N*- und *O*-alkylierten Verbindungen synthetisiert,<sup>¶</sup> wobei das erste Sub-Set Pyrrolopyrimidin-4-on Verbindungen mit linearen *N*-Alkylketten enthielt (**42a–42f**). Dabei zeigten Verbindungen **42a** und **42b** mit kleinen Methyl- bzw. Ethyl-Substituenten sowohl potente Inhibition der T790M EGFR-Variante als auch Selektivität gegenüber Wild-

<sup>ΔΔ</sup> Lösen der Kristallstruktur durch: C. Golz (AG C. Strohmann, TU Dortmund)

<sup>¶</sup> Synthese der Verbindungen durch: P. Klöveborn im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[143]</sup>

Typ auf biochemischem Level (Tabelle 15).<sup>†,‡‡</sup> Beide Verbindungen zeigten EC<sub>50</sub>-Werte von unter 200 nM gegenüber H1975 Zellen. Für Verbindung **42b** konnte eine Co-Kristallstruktur mit dem cSrc-Surrogat erhalten werden (Abbildung 20a) und bestätigt den angenommenen Bindemodus, wie oben beschrieben.<sup>\*\*</sup>

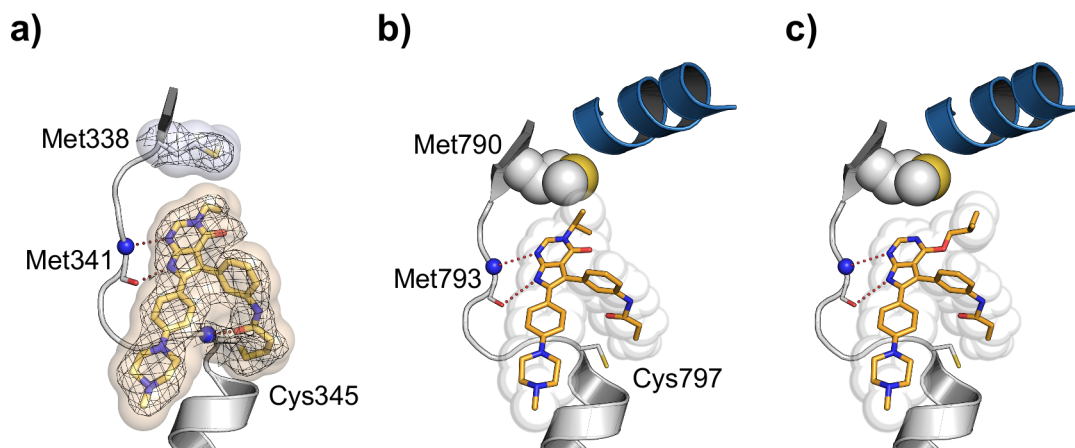


**Abbildung 19.** Mitsunobu Reaktion-basierte Derivatisierung resultierte in *O*-alkylierten Pyrrolopyrimidin und *N*-alkylierten Pyrrolopyrimidin-4-on EGFR Inhibitoren. **a)** Trennung der SEM-geschützten Verbindungen **41a** und **41b**. **b)** HMBC NMR-Analyse bestätigt die Struktur der getrennten Konstitutionsisomere.

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>‡‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien HCC827, H358 & A549 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

<sup>\*\*</sup> Lösen der Kristallstrukturen in cSrc durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)



**Abbildung 20.** a) Kristallstruktur-Analyse der Verbindung **42b** im Komplex mit cSrc-T338M/S345C als Modellsystem für EGFR-T790M. b–c) Angenommener Bindungsmodus von Pyrrolopyrimidin-4-on- und Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren **42g** und **31h**.

Verbindung **42c** weist einen Prop-1-yn-Substituenten auf und zeigt einen 10-fachen Aktivitäts-Verlust im biochemischen Assay, während eine mit den Verbindungen **42a–42b** vergleichbare zelluläre Aktivität in den getesteten Zelllinien nachgewiesen wurde. Eine erhöhte Beeinträchtigung der kRas-mutierten H358 und A549 Zelllinien ( $EC_{50} = 2,0$  bzw.  $1,4 \mu M$ ) deutet auf einen zytotoxischen Effekt hin, der verringerte  $EC_{50}$ -Werten in EGFR Zelllinien bewirkt. Für die Verbindungen **42d–42f**, welche längere Alkyl-Ketten aufweisen wurde im biochemischen Assay ein deutlicher Verlust an Selektivität nachgewiesen. Dabei wurden  $IC_{50}$ -Werte von bis zu  $20 nM$  für Verbindung **42f** mit einer 3-(Methylthio)propyl-Kette gegenüber EGFR-L858R/T790M bestimmt. Basierend auf dem in der Kristallstruktur mit **42b** gefundenen Bindungsmodus wird deutlich, dass kleine Reste bzw. kurze Alkyl-Ketten den hydrophoben Raum zwischen Grundgerüst und Methionin-Seitenkette ausfüllen können, während sterisch anspruchsvollere Gruppen an dieser Position in räumlichen Konflikt mit dem Türsteher kommen (Abbildung 20a–b). Daraus folgt ein Verlust an Bindungsaffinität, welcher in reduzierter inhibitorischer Aktivität resultiert. Dieser Trend wurde auch innerhalb der Verbindungen **42g–42h** mit verzweigten Alkyl-Ketten gefunden. Verbindung **42g** mit *iso*-Propyl-Rest zeigt vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte gegenüber mutierter Variante und EGFR-WT, während die *iso*-Butyl-Gruppe der Verbindung **42h** nicht toleriert ist und einen deutlichen Aktivitäts-Verlust gegenüber EGFR-L858R/T790M zeigt ( $IC_{50} = 3,4 nM$ ). Sterisch anspruchsvolle zyklische Verbindungen **42i–42l** sind im Kontext von Türsteher-mutiertem EGFR ebenfalls nicht toleriert, mit  $IC_{50}$ -Werten über  $1 nM$  und einem Verlust an Selektivität. Interessanterweise scheint Verbindung **42j** mit einem *cyclo*-Hexyl-Rest eine Ausnahme zu bilden, welche mit  $0,4 nM$  hoch-potent und mit moderater Selektivität die T790M-mutierte Variante inhibiert.

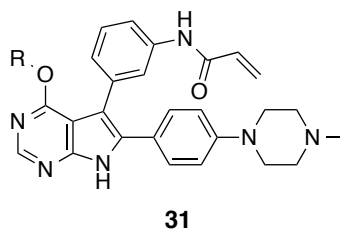
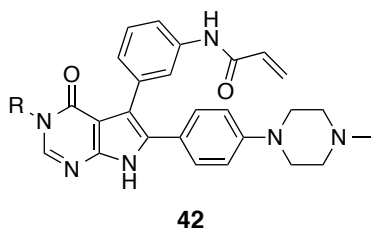
Auf zellulärem Level wurden aus der Serie der *N*-alkylierten Pyrimidinone besonders hohe inhibitorische Potenzen für die Verbindungen **42g** und **42j** gefunden. Diese zeigen EC<sub>50</sub>-Werte von 65 bzw. 77 nM gegenüber EGFR-mutierten H1975 Zellen, während A431 Wild-Typ Zellen bei Konzentrationen über 1 µM beeinträchtigt wurden. Auch kRas-mutierte Kontroll-Linien wurden erst bei hohen EC<sub>50</sub>-Werten von über 5,7 µM inhibiert. Interessanterweise wurde für Verbindung **42k** eine vergleichsweise hohe Potenz gegenüber H1975 Zellen gefunden (EC<sub>50</sub> = 228 nM), obwohl auf biochemischer Ebene ein moderater IC<sub>50</sub> von 7,7 nM gefunden wurde. Da die kRas Zelllinien erhöhte EC<sub>50</sub>-Werte von 1,8 bzw. 1,4 µM zeigten, und die Viabilität von A431 Zellen ebenfalls bei 453 nM beeinflusst wurde, lässt sich hier ein zytotoxischer Effekt vermuten. Im Weiteren wurde der Effekt der Verbindung **42g** auf die auto-Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR sowie der nachgeschalteten Signalkaskade untersucht.<sup>§</sup> Western Blot-Analysen zeigten einen Effekt auf H1975 Zellen zwischen 10 und 100 nM und eine etwa 10-fache Selektivität gegenüber Wild-Typ Zellen A431, in guter Übereinstimmung mit den zellulären Viabilitäts-Daten (Abbildung 21 und Anhang, Abbildung A4).

Es wurden darüberhinaus das Set an *O*-alkylierten Pyrrolopyrimidinen **31a–31h** getestet (Tabelle 15). Während *N*-substituierte Verbindungen zu sterischer Interferenz mit der Methionin-Seitenkette neigten (Abbildung 19), zeigten die *O*-substituierten Verbindungen sub-nanomolare Inhibition aller getesteter EGFR-Varianten auf biochemischer Ebene, weitestgehend unterhalb der Auflösungsgrenze des Assays. Analog wurde sehr potente Inhibition der HCC827 Zellen mit EC<sub>50</sub>-Werten <14 nM und der T790M-mutierten H1975 Zellen mit EC<sub>50</sub>-Werten unter 100 nM gefunden. Einzige Ausnahme stellt hier Verbindung **31e** dar, welche einen *O*-3-(Methylthio)propyl-Substituenten aufweist, und damit einen H1975 EC<sub>50</sub> von 281 nM bewirkte. Einen besonders ausgeprägten Effekt auf die Zell-Viabilität mit H1975 EC<sub>50</sub>-Werten unter 50 nM zeigten hierbei die Verbindungen **31g–31h** mit verzweigten Alkyl-Gruppen. Verbindung **31h** weist einen *iso*-Butyl-Rest auf und zeigt im Vergleich zu **31g** mit *iso*-Propyl-Substituent eine erhöhte Toleranz gegenüber Wild-Typ Zellen (A431 EC<sub>50</sub> 1700 vs. 334 nM). Auch kRas-mutierte Zelllinien zeigten EC<sub>50</sub>-Werte von 3,7 µM für Verbindung **31h**. Weiterführende Analysen mittels Western Blot zeigten analog einen ausgeprägten Effekt auf die Phosphorylierung des EGFR und nachgeschalteten Kinasen, wie AKT, bei etwa 10 nM in H1975 Zellen, während in A431 Zellen ein inhibitorischer Effekt bei 100 nM deutlich wurde (Abbildung 21 und Anhang, Abbildung A4).<sup>§</sup>

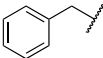


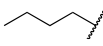
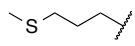




---

<sup>§</sup> Western-Blot-Analysen durch: J. Ketzer, T. Mühlenberg (AG S. Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen)

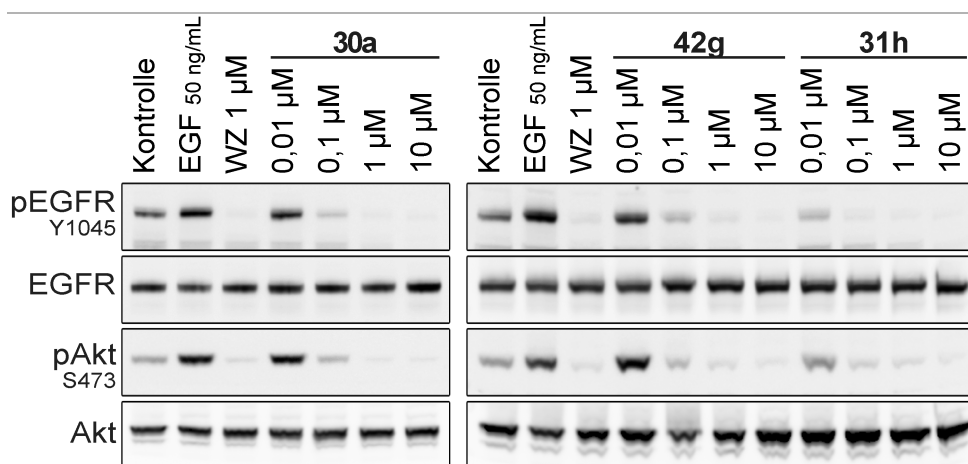


**Tabelle 15.** Biochemische und zelluläre Evaluation des zweiten Sets von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
<b>42a</b>		1,2 ± 0,1 0,5 ± 0,0 0,5 ± 0,0	1100 ± 350 82 ± 20 188 ± 64	9500 ± 400 8800 ± 700
<b>42b</b>		0,4 ± 0,2 0,2 ± 0,1 0,5 ± 0,0	739 ± 287 15 ± 1 144 ± 41	3500 ± 2000 4300 ± 1200
<b>42c</b>		5,1 ± 0,1 4,0 ± 2,7 4,9 ± 1,3	1000 ± 340 22 ± 2 183 ± 48	2000 ± 390 1400 ± 620
<b>42d</b>		0,2 ± 0,0 0,3 ± 0,3 4,5 ± 0,8	767 ± 151 <14 550 ± 157	3300 ± 690 3000 ± 1100
<b>42e</b>		0,4 ± 0,1 0,1 ± 0,1 0,9 ± 0,1	1900 ± 600 <14 723 ± 188	>30000 22000 ± 11000
<b>42f</b>		4,6 ± 1,1 1,7 ± 0,5 20 ± 6	15000 ± 5900 134 <sup>a</sup> 16000 ± 3100	12000 <sup>a</sup> 25000 ± 7600
<b>42g</b>		1,0 ± 0,1 0,4 ± 0,0 1,0 ± 0,3	1400 ± 920 67 ± 7 65 ± 11	9400 ± 3400 5700 ± 240
<b>42h</b>		0,8 ± 0,2 0,2 ± 0,1 3,4 ± 1,4	1100 ± 500 45 ± 7 686 ± 199	6800 ± 870 6100 ± 2100
<b>42i</b>		0,1 ± 0,0 <0,1 1,2 ± 0,1	502 ± 166 <14 263 ± 46	1900 ± 50 2100 ± 990
<b>42j</b>		0,4 ± 0,1 0,2 ± 0,1 0,4 ± 0,1	1100 ± 660 <14 77 ± 15	6300 ± 1300 6100 ± 4600
<b>42k</b>		1,1 ± 0,8 0,9 ± 0,6 7,7 ± 3,9	453 ± 218 <14 228 ± 73	1800 ± 520 1400 ± 990

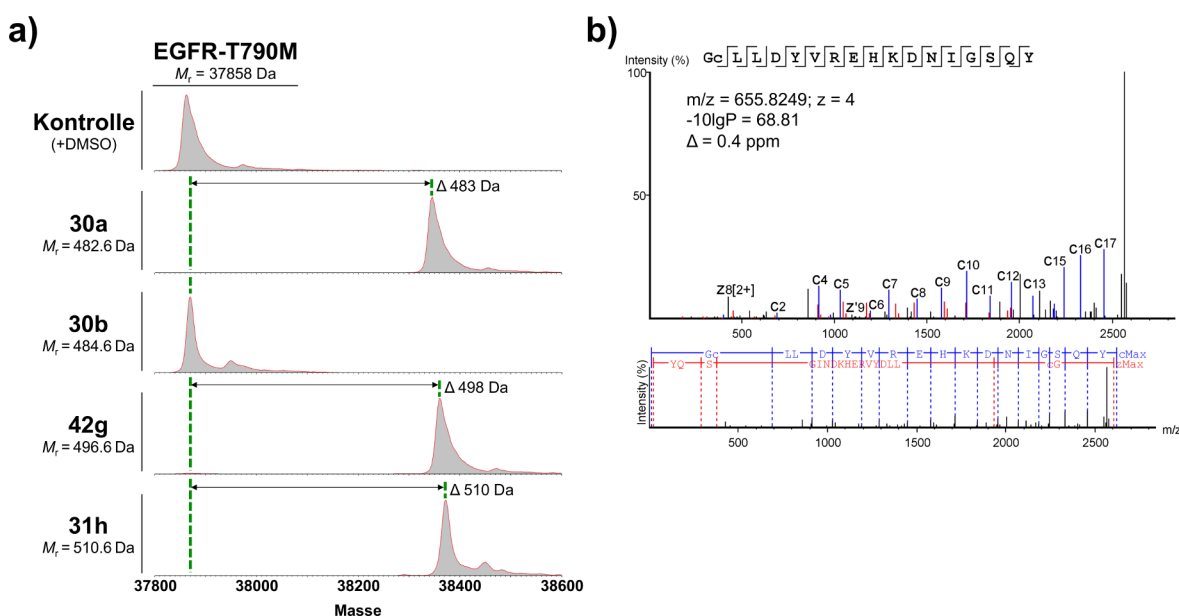
Cpd	R	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	kRas CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT L858R L858R/T790M	A431 HCC827 H1975	H358 A549
42l		1,0 ± 0,2 1,5 ± 0,8 21 ± 1	1100 ± 170 44 ± 26 1600 ± 260	>30000 25000 ± 8200
31a		0,4 ± 0,0 0,1 ± 0,0 0,2 ± 0,0	638 ± 247 <14 60 ± 8	1700 ± 720 840 ± 289
31c		0,2 ± 0,1 <0,1 0,1 ± 0,1	759 ± 394 <14 64 ± 25	1700 ± 760 1000 ± 50
31d		<0,1 <0,1 <0,1	1500 ± 270 <14 64 ± 8	1600 ± 810 1100 ± 180
31e		0,2 ± 0,0 <0,1 0,1 ± 0,1	3700 ± 500 <14 281 ± 88	2600 ± 340 3000 ± 920
31f		0,2 ± 0,0 <0,1 <0,1	1800 ± 740 n.b. 107 ± 45	n.b. n.b.
31g		0,1 ± 0,0 <0,1 0,1 ± 0,0	334 ± 50 <14 38 ± 19	2700 ± 760 1800 ± 130
31h		0,2 ± 0,2 <0,1 <0,1	1700 ± 400 <14 51 ± 19	3700 ± 1500 3700 ± 1800
31i		12 ± 4 12 ± 4 24 ± 12	24000 ± 6400 557 ± 266 28000 ± 2600	>30000 >30000

<sup>a</sup>Einfachbestimmung, n.b. = nicht bestimmt



**Abbildung 21.** Western Blot-Analysen von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren in H1975 Zellen.

Röntgen-Kristallstruktur-Analysen und biochemische Charakterisierung der Beeinflussung der Kinase-Aktivität durch die hier entwickelten Pyrrolopyrimidinone und Pyrrolopyrimidine erlaubten bereits erste Einblicke in deren Bindungseigenschaften. Diese zeigten eine kovalente Modifikation des reaktiven Cysteins in EGFR, was zusätzlich durch MS-basierte Methoden untermauert wurde. Inkubation von repräsentativen Verbindungen **30a–30b**, **42g** und **31h** mit EGFR-T790M resultierte in einer Massenzunahme, korrespondierend zur einfachen kovalenten Modifikation der Kinase durch die getesteten Verbindungen, wie massenspektrometrische Untersuchung zeigte (Abbildung 22a). Tandem-Massenspektrometrie nach einem proteolytischen Verdau des kovalenten Adduktes bestätigte weiterhin Cys797 als kovalenten Anker-Punkt für Verbindung **31h** (Abbildung 22b).<sup>¶¶</sup>



**Abbildung 22.** a) Massenspektrometrische Analyse der kovalenten Bindungsbildung von ausgewählten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit EGFR-T790M. b) Nano-LC-MS/MS Analyse bestätigte die kovalente Modifikation von Cys797 (innerhalb des Peptids **GC\*LLDYVREHKDNIQSQY**) durch den Inhibitor **31h**.

Weitere detaillierte Einblicke erlaubte eine Analyse der Bindungskinetik der Verbindungen **42g** und **31h**.<sup>\*\*</sup> In Übereinstimmung mit den bisherigen Feststellungen, zeigte die *N*-iso-Propyl-substituierte Verbindung **42g** eine schwache Affinität gegenüber EGFR Wild-Typ und L858R-mutierter Variante ( $K_i$ -Werte von 10 nM), während gegenüber EGFR-L858R/T790M ein deutlicher

<sup>¶¶</sup> Nano-LC-MS/MS durch: B. Blank-Landeshammer, L. Kollipara, R.P. Zahedi (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V., Dortmund)

<sup>\*\*</sup> Biochemische Charakterisierung der Mutante EGFR-L858R/T790M/C797S und Messung der Bindungskinetik durch: M. Keul (AG D. Rau, TU Dortmund)

Affinitätsverlust ( $K_i = 15$  nM) festgestellt wurde (Tabelle 16). Die Bindung an die EGFR-Kinasedomäne wird hier hauptsächlich durch die Ausbildung der kovalenten Bindung stabilisiert, welche vergleichsweise schnell ausgebildet wird ( $k_{\text{inact}} = 0,26 \text{ min}^{-1}$ ). Analog bindet Verbindung **42g** nur ineffizient an die C797S-mutierte EGFR-Variante, woraus eine schwache Inhibition der Kinase-Aktivität resultiert ( $\text{IC}_{50} = 555$  nM). Hingegen zeigte die *O*-substituierte Verbindung **31h** mit *iso*-Butyl-Rest eine sehr hohe sub-nanomolare Bindungsaffinität und weist keinen Verlust gegenüber Türsteher-mutiertem EGFR auf ( $K_i = 0,4$  nM). Bedingt durch die hohe reversible Affinität für die Bindetasche, wurde auch ein hoher inhibitorischer Effekt gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S mit einem  $\text{IC}_{50}$  von 8,5 nM festgestellt.

**Tabelle 16.** Analyse der Bindungskinetik von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

Cpd	EGFR	HTRF $\text{IC}_{50}$ [nM]	$K_i$ [nM]	$k_{\text{inact}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{inact}}/K_i$ [μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>42g</b>	WT	1,0 ± 0,1	10 ± 1	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,06
	L8585R	0,4 ± 0,0	10 ± 1	0,19 ± 0,08	0,31 ± 0,11
	L858R/T790M	1,0 ± 0,3	15 ± 3	0,26 ± 0,09	0,30 ± 0,09
	L858R/T790M/C797S	555 ± 139	-	-	-
<b>31h</b>	WT	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,05 ± 0,01	1,98 ± 0,22
	L8585R	<0,1	0,5 ± 0,1	0,28 ± 0,08	8,78 ± 0,65
	L858R/T790M	<0,1	0,4 ± 0,1	0,17 ± 0,09	8,08 ± 0,77
	L858R/T790M/C797S	8,5 ± 3,7	-	-	-

Anschließend wurden die pharmakokinetischen Parameter für ein repräsentatives Set an TKIs untersucht.<sup>§§</sup> Dabei wurde der Abbau der Verbindungen durch Maus Leber-Mikrosomen (MLM), welche metabolisierende Enzyme enthalten, mit MS-basierten Methoden analysiert. Daraus lässt sich die intrinsische Clearance ( $\text{CL}_{\text{int}}$ ) ableiten, welche die Geschwindigkeit des Metabolismus einer Substanz angibt (Anhang, Tabelle A3). Im Allgemeinen wurde dabei festgestellt, dass *N*-alkylierte Verbindungen eine höhere metabolische Stabilität aufweisen, zwischen 4 und 84 μL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, verglichen mit *O*-alkylierten Verbindungen, welche  $\text{CL}_{\text{int}}$ -Werte von 46 bis 128 μL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> aufwiesen. Carbozyklische Substituenten bewirkten eine hohe Abbaurate der getesteten Verbindungen **42i** und **31f**, unabhängig von der *N*- oder *O*-Substitutionsposition. Die vielversprechenden Verbindungen **31g** und **31h** zeigten gute Stabilität, beide mit 46 μL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Im Weiteren wurde die

<sup>§§</sup> Messung der ADME-Parameter durch: M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht (Lead Discovery Center GmbH, LDC, Dortmund) und Messung der MLM-Daten durch: J. Hardick (AG D. Rauh, TU Dortmund)

Lipophilie (cLogP) und die Liganden Lipophilizitäts-Effizienz (LLE), welche ein Maß für die Übersetzung der Lipophilie in inhibitorische Potenz angibt, bestimmt (Abbildung 23a und Anhang, Tabelle A3). Generell sind dabei die *N*-alkylierten Verbindungen mit einem cLogP zwischen 2,9 und 4,5 weniger lipophil als die *O*-alkylierten Verbindungen mit Werten von 4,7 bis 5,5. Diese Werte sind in einer akzeptablen Größenordnung, während die LLE der vorteilhaften *O*-alkylierten Verbindungen mit 1,5-2,7 eher moderat ist. Verbindung **31h** wurde aufgrund der besseren Selektivität gegenüber EGFR Wild-Typ Zellen, sowie der höheren Potenz im Kontext der C797S-Mutation für die weitere Profilierung ausgewählt (Tabelle 17). Diese zeigte hohe Stabilität gegenüber humanen Leber-Mikrosomen mit einem  $CL_{int}$ -Parameter von  $6,7 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , 100% chemische Stabilität im Blutplasma und komplette Bindung an Plasma-Proteine. Die Fähigkeiten zur Passage von Membranen wurde im PAMPA-Assay gegenüber einer artifiziellen Membran mit einer Permeabilität von 88% bestimmt. Das Verhältnis von Influx und Efflux über eine Schicht von Caco-2 Epithel-Zellen war mit einem Wert von 3,1 akzeptabel.

Daraufhin wurde Verbindung **31h** ausgewählt für erste *in vivo*-Studien in Mäusen, welche die Pharmakokinetik nach intraperitonealer (IP), intravenöser (IV) und peroraler (PO) Verabreichung über einen Zeitraum von 135 min lieferte (Abbildung 23b und Tabelle A4).<sup>\*</sup> Ein geeignetes Profil wurde für die intraperitoneale Route gefunden (Dosis  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), wobei eine hohe Exposition mit einer AUC von  $3917 \text{ h ng mL}^{-1}$  und einer Halbwerts-Zeit von 1,2 h gefunden wurde. Die maximal erreichte Plasma-Konzentration lag bei  $3,5 \mu\text{M}$  und betrug auch nach 2,25 h noch über  $1 \mu\text{M}$ , womit die Konzentration im Blutplasma über den gesamten Zeitraum mehr als das 20-Fache des  $EC_{50}$  in H1975 Zellen betrug.

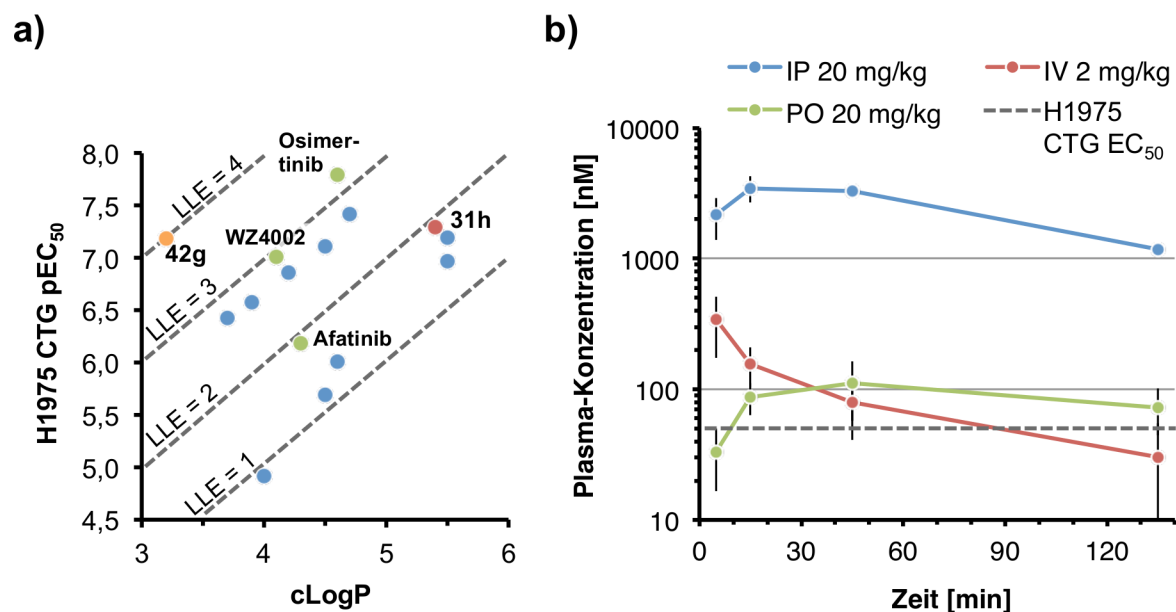
---

<sup>\*</sup> *In vivo*-Studien durch G. Günther, J.G. Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung, IfADo, Dortmund) und Daten-Analyse durch: A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht (Lead Discovery Center GmbH, LDC, Dortmund)

**Tabelle 17.** Pharmakokinetische Parameter des Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitors **31h**.

Pharmakokinetischer Parameter (Human / Maus)	31h	WZ4002	Osimertinib
<b>Plasmastabilität</b> [% verbleibend]	99 / 100	86 / 78	78 / 75
<b>Plasma-Protein Bindung</b> [% gebunden]	100 / 100	99 / 98	97 / 98
<b>Mikrosomaler Abbau</b> $CL_{int}$ [ $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	6,7 / 46	11 / 66	4,1 / 60
<b>PAMPA Flux</b> [%]	88	n.b.	88
<b>Caco-2: <math>P_{app}</math> A→B</b> [ $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ ]	1,2	4,9	5,0
<b>Caco-2: <math>P_{app}</math> B→A</b> [ $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ ]	3,6	11,7	6,8
<b>Caco-2: Verhältnis</b> (B→A) : (A→B)	3,1	2,4	1,4

PAMPA = parallel artificial membrane permeability assay, n.b. = nicht bestimmt.



**Abbildung 23. a)** Auftragung der zellulären Potenz einer Auswahl von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren gegen berechnete cLogP-Werte und Ermittlung der Liganden Lipophilizitäts-Effizienz (LLE). **b)** *in vivo*-Pharmakokinetik der Verbindung **31h** in Mäusen nach intraperitonealer (IP), intravenöser (IV) und peroraler (PO) Verabreichung.

Zusammenfassend wurde hier mit der Mitsunobu-Reaktion an Pyrrolopyrimidinen eine synthetische Methode zur schnellen Derivatisierung dieses Grundgerüsts vorgestellt. Die Bildung eines leicht trennbaren Gemisches von Konstitutionsisomeren resultierte in *N*-substituierten Pyrrolopyrimidin-4-onen und *O*-substituierten Pyrrolopyrimidinen. Es wurde eine Serie von insgesamt 32 Verbindungen generiert, welche hohe biochemische und zelluläre Potenz gegenüber T790M-mutiertem EGFR zeigten. Es wurde außerdem Selektivität gegenüber Wild-Typ EGFR erzielt.

Charakterisierung der Bindungskinetik und Einblicke in den Bindungsmodus durch Co-Kristallisationsstudien lieferten eine Erklärung für die potente Inhibition der C797S-Variante durch *O*-alkylierte Pyrrolopyrimidin-basierte TKIs. Diese wiesen biochemische IC<sub>50</sub>-Werten im nanomolaren Bereich auf und sind damit den bisher verfügbaren Wirkstoffen der dritten Generation, sowie den Chinazolin-basierten EGFR-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation in dieser Hinsicht überlegen. Western Blot-Analysen, sowie die Untersuchung der ADME-Parameter und *in vivo* Pharmakokinetik zeigten weiterhin das Potential der hier vorgestellten Verbindungen. Im Weiteren zeigen die Inhibitoren alle Voraussetzungen für einen Kandidaten der vierten Generation, wobei die Testung in einem zellulären Modellsystem mit EGFR-C797S aussteht.

### 3.2.5. Analyse der inhibitorischen Aktivität gegenüber Osimertinib-resistenten Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits mehrere Inhibitoren mit biochemischer Potenz gegenüber C797S-mutiertem EGFR identifiziert, jedoch ist darüber hinaus die Evaluation dieser Verbindungen in einem zellulären Testsystem nötig um deren Potential zu ermitteln. Dazu wurde die Mutation in PC9 Zellen, welche EGFR-delE746\_A750 aufweisen, durch CRISPR/Cas9 Genom-Editierung eingeführt. So wurden die Zelllinien PC9(T790M), sowie PC9(T790M/C797S) generiert und eine Auswahl an Verbindungen getestet (Tabelle 18).<sup>-, ‡, †, \*\*</sup>

Dabei wurde deutlich, dass ein genereller Zusammenhang zwischen der biochemischen und zellulären Aktivität besteht und dass daher die in den Assays verwendeten unterschiedlichen aktivierenden Mutationen L858R und delE746\_A750 vergleichbar sind. Weiterhin zeigten die bisher vorgestellten Inhibitoren mit hoher biochemischer Potenz ( $IC_{50}$ -Werte unter 15 nM) gegenüber PC9(T790M/C797S) zelluläre Inhibition mit  $EC_{50}$ -Werten zwischen 2,6  $\mu$ M und 8,3  $\mu$ M. Die hohe Schwankung innerhalb dieser Werte könnte darauf hindeuten, dass abgesehen von der im biochemischen Assay nachgewiesenen Inhibition der Kinase-Aktivität weitere Parameter die Effektivität im zellulären System beeinflussen. Für Osimertinib wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von 2,7  $\mu$ M gegenüber mutierten Zellen bestimmt, obwohl dieses eine halbmaximale Inhibition der Kinase bei 118 nM bewirkte. Osimertinib zeigte jedoch hohe Potenz in mehreren zellulären Systemen (Tabelle 18 und Tabelle 3) und vorteilhafte Eigenschaften im Bezug auf die Passage von Biomembranen, wie der in Caco-2 Zellen bestimmte A $\rightarrow$ B und B $\rightarrow$ A Transport mit 50 bzw. 68 nm s<sup>-1</sup> zeigte (Tabelle 17). Die getesteten kovalenten Inhibitoren zeigten erwartungsgemäß eine hohe Potenz gegenüber der T790M-mutierten Zelllinie. Sie unterliegen durch die irreversible Alkylierung des EGFRs nicht der Verdrängung durch hohe zelluläre ATP-Konzentrationen und können selbst durch geringe Konzentrationen im Zellinneren eine dauerhafte Besetzung und Inhibition der Kinase-Domäne erreichen. Dadurch werden diese dem Gleichgewicht an der Zellmembran entzogen und überkompensieren vermutlich teilweise eine weniger optimale Zellgängigkeit, während im reversiblen Szenario der PC9(T790M/C797S) die lokale Konzentration

---

<sup>-</sup> Generierung der Zelllinien durch: D. Plenker (AG M. Sos, Universitätsklinikum Köln)

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien PC9, PC9(T790M) und PC9(T790M/C797S) durch: H.L. Tumbrink (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>\*\*</sup> Biochemisch Charakterisierung von EGFR-L858R/T790M/C797S durch: M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)



am Wirkort eine entscheidende Rolle spielt. Für reversible Verbindungen wurden vergleichbare  $EC_{50}$ -Werte in beiden Zelllinien nachgewiesen.

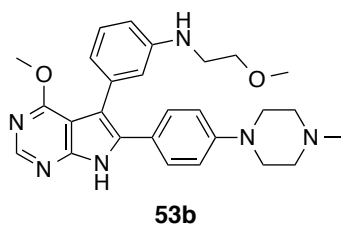
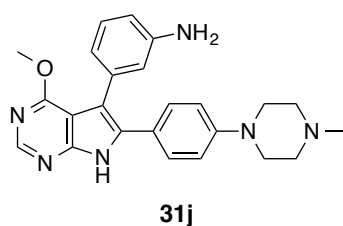
Eine hohe Potenz wurde für die reversiblen Verbindungen **31j** und **53b** (Schema 5) gefunden, mit 1,6 bzw. 2,5  $\mu M$ .<sup>11</sup> Damit zeigen diese Verbindungen verglichen mit klinisch verwendeten Inhibitoren, wie Osimertinib, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber den resistenten Zellen. Möglicherweise vermittelt das anilinische Amin eine hohe Löslichkeit und Zellgängigkeit der Verbindungen. Außerdem könnte sich eine gewisse sterische Abstoßung zwischen dem Acryl- oder Propionylamid mit der polaren Seitenkette des Ser797 nachteilig auf die entsprechenden Verbindungen auswirken, sodass das Anilin **31j** oder die Heteroatom-enthaltende Alkyl-Kette der Verbindung **53b** hier vorteilhaft sind. Durch die Einbringung von polaren Gruppen in Nähe der mutierten Aminosäure könnten die vorgestellten Verbindungen in zukünftigen Arbeiten weiter optimiert werden.

Um weitere Inhibitoren mit zellulärer Aktivität zu identifizieren und Einblicke in deren molekulare Eigenschaften zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit dem LDC eine fokussierte Testung ausgewählter Verbindungen vorgenommen.<sup>§§</sup> Nachdem Pyrimidin-basierte Inhibitoren der Kinase ALK als potente Inhibitoren der zellulären Aktivität im Kontext der C797S-Mutation des EGFR beschrieben wurden,<sup>[90]</sup> wurden diese Ergebnisse mit denen des PC9-Testsystems verglichen, sowie weitere ähnliche Verbindungen getestet (Tabelle 17). In den Arbeiten von Uchibori *et al.* wurde ein Brigatinib-Analogon, AZD3463,<sup>[146]</sup> TAE684<sup>[147]</sup> und Ceritinib<sup>[148]</sup> in Ba/F3-Zellen mit EGFR-delE746\_A750/T790M/C797S vermessen und in dieser Reihenfolge aufsteigende  $EC_{50}$ -Werte gefunden. Dieses Ergebnis wurde hauptsächlich der Rolle des Phosphons, Indols bzw. Sulfons dieser Verbindungen zugeschrieben, wobei diese Gruppen polare Interaktionen mit dem katalytischen Lysin der Kinase ausbilden und so eine hohe reversible Bindung vermitteln. Im Bezug auf die höhere Potenz von TAE684 verglichen mit Ceritinib wurde ein negativer Einfluss der *iso*-Propoxy-Gruppe vermutet, jedoch unterscheiden sich beide auch durch ihre polaren Löslichkeitsgruppen. Diese Ergebnisse konnten hier auf biochemischer Ebene bestätigt werden und validieren die simplistische Abbildung der direkten EGFR-Inhibition im Ba/F3-Modell. Im Kontext der komplexeren mutierten PC9-Zellen wurde jedoch eine sehr hohe Potenz für AZD3463 gefunden ( $EC_{50}$  = 563 nM), während Brigatinib und Ceritinib Aktivitäten im mikromolaren Bereich erzielten und TAE684 einen  $EC_{50}$  von 4,9  $\mu M$  aufwies.

---

<sup>11</sup> Synthese der Verbindungen durch: L. Hodson (AG W. van Otterlo, Universität Stellenbosch, Südafrika) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>§§</sup> Auswahl und Bereitstellung einer Vielzahl von Verbindungen durch: C. Schultz-Fademrecht (Lead Discovery Center GmbH, LDC, Dortmund)

**Tabelle 18.** Biochemische und zelluläre Evaluation einer Auswahl der vorgestellten Inhibitoren im Kontext von C797S-mutiertem EGFR.

Cpd	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	WT L858R/T790M L858R/T790M/C797S	A431 PC9(T790M) o. H1975 PC9(T790M/C797S)
<b>1l</b>	16 ± 6 0,6 ± 0,4 88 ± 16 <sup>a</sup>	3600 ± 1500 117 ± 90 9500 ± 1700
<b>1n</b>	35 ± 14 2,5 ± 1,4 838 ± 85 <sup>a</sup>	6800 ± 4500 285 ± 189 23000 ± 1900
<b>12d</b>	<1 <1 90 <sup>b</sup>	4100 ± 2800 <14 <sup>c</sup> 3700 ± 100
<b>13i</b>	<1 <1 8 <sup>b</sup>	5300 ± 1600 480 ± 55 <sup>c</sup> 3000 ± 710
<b>13j</b>	<1 <1 7 <sup>b</sup>	17000 ± 3800 7200 ± 2100 <sup>c</sup> 2600 ± 1000
<b>30a</b>	15 ± 10 4,0 ± 1,7 40 ± 16	768 ± 271 253 ± 141 13000 ± 1500
<b>30b</b>	460 ± 162 302 ± 84 8,7 ± 2,5	5700 ± 60 6600 ± 1100 8300 ± 2000
<b>42g</b>	1,0 ± 0,1 1,0 ± 0,3 555 ± 139	1400 ± 920 256 ± 113 15000 ± 1600
<b>42j</b>	0,4 ± 0,1 0,4 ± 0,1 22 ± 17	1100 ± 660 256 ± 119 22000 ± 3200
<b>31d</b>	<0,1 <0,1 9,4 ± 1,5	1500 ± 270 79 ± 46 5100 ± 590
<b>31g</b>	0,1 ± 0,0 <0,1 8,6 ± 3,2	334 ± 50 43 ± 23 4800 ± 600

Cpd	EGFR HTRF	EGFR CTG
	IC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]
	WT L858R/T790M L858R/T790M/C797S	A431 PC9(T790M) o. H1975 PC9(T790M/C797S)
31h	0,2 ± 0,2	1700 ± 400
	<0,1	86 ± 53
	8,5 ± 3,7	5300 ± 670
31j	2,3 ± 0,4	1200 ± 230
	1,7 ± 1,4	2200 ± 480
	12 ± 10	1600 ± 200
53b	3,6 ± 1,5	1100 ± 150
	1,8 ± 1,0	3500 ± 140
	9,3 ± 6,3	2500 ± 490
Gefitinib	0,2 ± 0,1	1700 ± 790
	185 ± 98	6700 ± 2300
	250 ± 23	7300 ± 2800
Afatinib	<0,1	634 ± 312
	0,3 ± 0,1	604 ± 362
	25 ± 17	4400 ± 540
Osimertinib	1,0 ± 0,6	756 ± 340
	0,3 ± 0,0	<14
	118 ± 11	2700 ± 490
Rociletinib	10 ± 1	1900 ± 470
	0,3 ± 0,1	174 ± 106
	527 ± 88	4700 ± 2600
WZ4002	9,6 ± 7,0	2100 ± 440
	0,2 ± 0,1	48 ± 9
	452 ± 189	3400 ± 550
EGF816	1,7 ± 0,8	4400 ± 1400
	0,3 ± 0,1	348 ± 190
	398 ± 105	6900 ± 900
Staurosporine	2,5 ± 0,3	n.b.
	0,2 ± 0,2	20 ± 5
	1,5 ± 0,0	18 ± 6

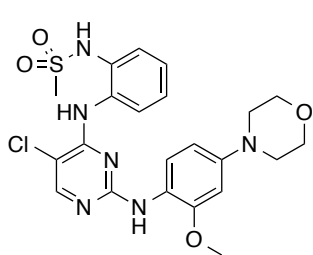
<sup>a</sup>Abweichendes Assay-Konstrukt; <sup>b</sup>Einfachbestimmung, durchgeführt bei Reaction Biology; <sup>c</sup>Daten der Zelllinie H1975; n.b. = nicht bestimmt.

Wie bereits vermutet könnte auch hier die Permeation der Zellmembran einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Aktivität haben. Insbesondere der Vergleich zwischen den sehr ähnlichen Inhibitoren TAE684 und Ceritinib zeigt, dass Ceritinib einen deutlich geringeren Effekt auf die isolierte Kinase-Domäne aufweist ( $IC_{50} = 83$  vs.  $48$  nM), dieser jedoch im zellulären Kontext überkompensiert wird ( $EC_{50} = 1,7$  vs.  $4,9$   $\mu$ M). Eine mögliche Erklärung könnte die Löslichkeits-vermittelnde Piperazin-Gruppe des TAE684 sein, welche mehrfach protonierbar ist, sodass das geladene Molekül die zelluläre Membran weniger gut überwinden kann. Gleichzeitig zeigt Naquotinib<sup>[149,150]</sup> vergleichbare inhibitorische Potenz verglichen mit Ceritinib, sowohl im biochemischen wie auch im zellulären Kontext, obwohl dieses die gleiche Piperazin-Einheit wie TAE684 aufweist. Vermutlich spielen weitere Faktoren eine Rolle, die noch zu identifizieren sind. Der Effekt der Löslichkeits-Gruppe wird weiterhin deutlich beim Vergleich der strukturell sehr ähnlichen JAK-Inhibitoren Fedratinib<sup>[151]</sup> und einem Methyl-Piperazin-Analogon,<sup>[152]</sup> welche vergleichbare biochemische Potenz ( $IC_{50} = 442$  bzw.  $427$  nM) aufweisen, jedoch zellulär deutlich unterschiedliche  $EC_{50}$ -Werte von  $15$  bzw.  $4,1$   $\mu$ M zeigen. Im Rahmen dieser Studie wurden zwei weitere sehr potente Inhibitoren der C797S-mutierten PC9-Zellen identifiziert: CZC-54252,<sup>[153]</sup> ein Inhibitor der LRRK2-Kinase, zeigt einen sehr hohen  $EC_{50}$ -Wert von  $786$  nM und nanomolare biochemische Inhibition der Kinase-Aktivität. Verbindung **43** wies einen  $EC_{50}$  von  $1$   $\mu$ M auf und beide Moleküle tragen keine unter physiologischen Bedingungen protonierbaren Gruppen. Abschließend lässt sich sagen, dass CZC-54252 und Ceritinib die höchsten zellulären Potenz gegenüber C797S-mutierten PC9 Zellen innerhalb dieser Untersuchung aufwiesen ( $EC_{50} = 786$  und  $799$  nM). Beide Verbindungen basieren auf dem Pyrimidin-Grundgerüst und weisen ein ähnliches Substitutions-Muster auf. Sie teilen ein Amin in vergleichbarer Position, im Sulfonamid bzw. im Indol-Heterozyklus, welches unter Umständen eine Rolle bei der Inhibition spielen könnte. Die hier identifizierten Strukturelemente könnten in zukünftigen Arbeiten auf die Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren übertragen werden, um deren Wirksamkeit gegenüber C797S-mutierten Zellen zu erhöhen. Ein durch ALK-Inhibition ausgelöster Effekt wurde durch die Testung der Wirkstoffe Crizotinib und Lorlatinib ausgeschlossen, welche zelluläre  $EC_{50}$ -Werte von über  $9$   $\mu$ M gegenüber mutierten PC9-Zellen zeigten.

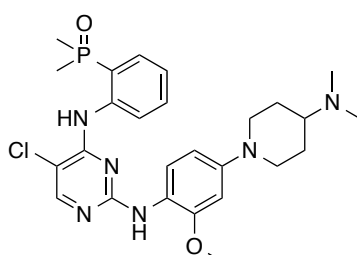
Obwohl weitere Einblicke in die molekularen und pharmakologischen Eigenschaften der Inhibitoren nötig sind, um die Zusammenhänge zwischen biochemischer Inhibition der Kinase-Aktivität und Potenz im zellulären Modell aufzuklären, lässt sich basierend auf den angestellten Überlegungen vermuten, dass inhibitorische Potenz im Kontext von EGFR-C797S-mutierten Zellen maßgeblich durch die Membrangängigkeit und die resultierende zelluläre Konzentration des Inhibitors beeinflusst wird.

Zusammenfassend wurden im Rahmen diese Arbeit die nötigen Eigenschaften eines EGFR-Inhibitors der vierten Generation herausgearbeitet. Die gewonnenen Einblicke wurden in mehreren Serien an Verbindungen umgesetzt und resultierten in der Entwicklung von Pyrrolopyrimidinen, welche hohe biochemische Potenz gegenüber der Wirkstoff-resistenten aktivierten EGFR-Mutante T790M/C797S aufwiesen. Die Wirksamkeit dieser Verbindungen wurde im zellulären System untersucht und Studien zur weiteren möglichen Optimierung der Verbindungen durchgeführt.

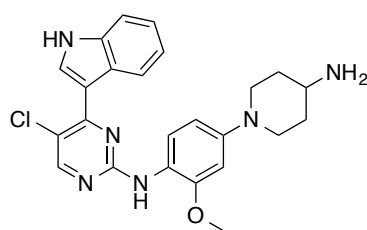
**Tabelle 19.** Biochemische und zelluläre Evaluation von Pyrimidin-basierten Inhibitoren mit struktureller Ähnlichkeit zu Brigatinib.



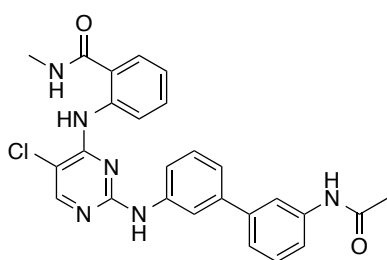
**ZC-54252**



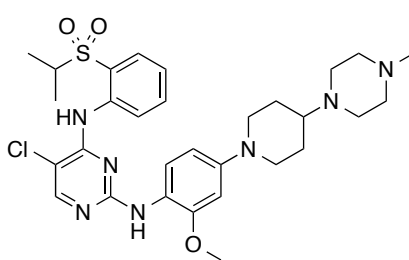
**Brigatinib-Analogon**



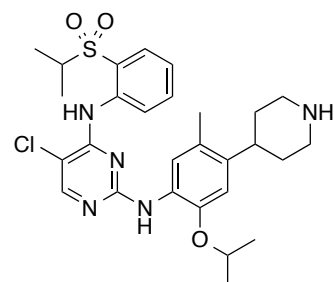
**AZD3463**



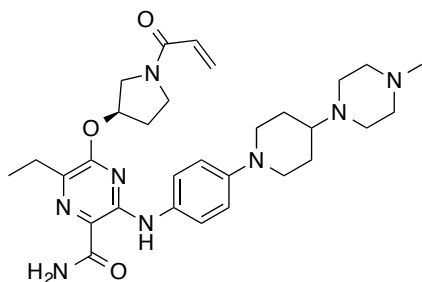
**43**



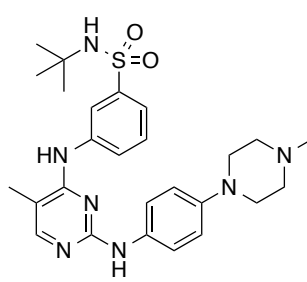
**TAE684**



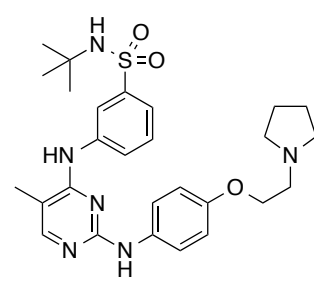
**Ceritinib**



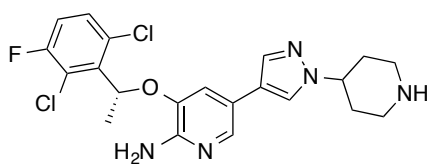
**Naquotinib**



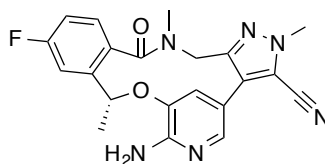
**Fedratinib-Analogon**



**Fedratinib**



**Crizotinib**



**Lorlatinib**

Cpd	EGFR HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]	pK <sub>s</sub> <sup>a</sup>
	L858R/T790M/C797S	PC9(T790M) PC9(T790M/C797S)	
<b>CZC-54252</b>	1,2 ± 0,9	494 ± 33 786 ± 166	-
<b>Brigatinib- Analogon</b>	3,1 ± 1,1	1300 ± 120 1800 ± 200	9,50
<b>AZD3463</b>	20 ± 10	563 ± 219 799 ± 112	9,63
<b>43</b>	44 ± 10	n.b. 1000 ± 250	-
<b>TAE684</b>	48 ± 18	3400 ± 1100 4900 ± 870	3,63 ; 8,89
<b>Ceritinib</b>	83 ± 52	1700 ± 640 1700 ± 520	9,89
<b>Naquotinib</b>	84 ± 25	n.b. 1500 ± 250	3,67 ; 8,89
<b>Fedratinib- Analogon</b>	427 ± 156	n.b. 4100 ± 210	8,64
<b>Fedratinib</b>	442 ± 165	n.b. 15000 ± 1700	9,06
<b>Crizotinib</b>	3100 ± 300	n.b. 9000 ± 310	9,27
<b>Lorlatinib</b>	238 ± 34	n.b. 16000 ± 1700	-

<sup>a</sup>Berechnet mit Chem 3D (Perkin Elmer); n.b. = nicht bestimmt.

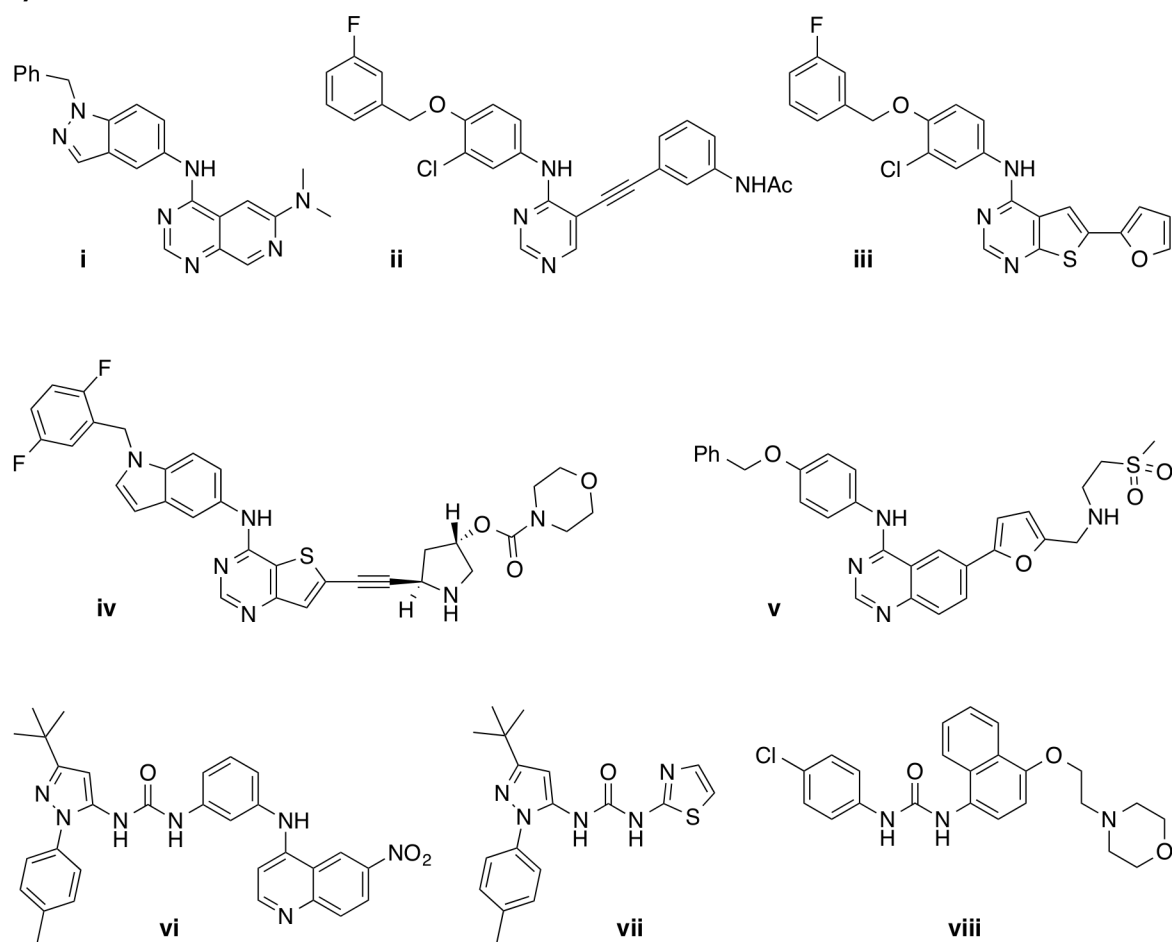
### 3.3. Entwicklung von Inhibitoren des Her2 und EGFR mit Mutationen in Exon20

#### 3.3.1. Substanzdurchmusterung-basierte Entwicklung von TKIs

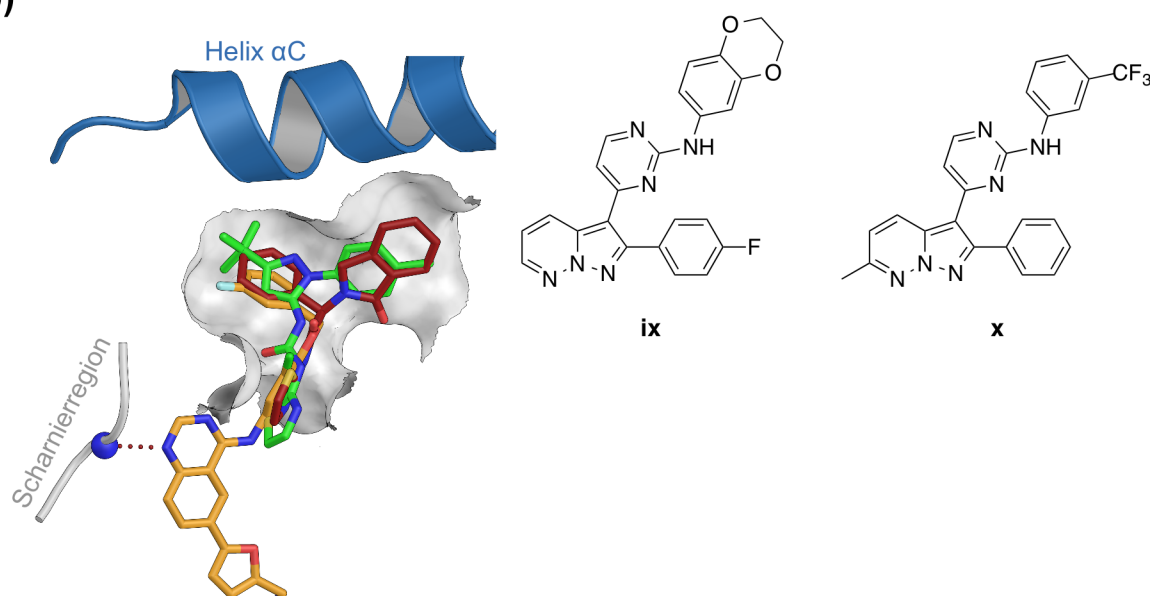
In der Bestrebung, Inhibitoren des Exon20-mutierten Her2 zu entwickeln, wurde eine Kinase-fokussierte Substanzbibliothek durchmustert. Diese wurde teilweise von GSK und Roche bereitgestellt und umfasste 1636 chemische Entitäten, die mittels biochemischem HTRF gegen Her2-A775\_G776insYVMA und Her2 Wild-Typ bei jeweils 10 und 1  $\mu$ M getestet wurden. Für Verbindungen, deren Restaktivität  $\geq 30\%$  bei 10  $\mu$ M bzw.  $\geq 50\%$  bei 1  $\mu$ M lag, sowie weitere chemisch ähnliche Verbindungen wurden Dosis–Wirkungs-Kurven aufgenommen und  $IC_{50}$ -Werte bestimmt.<sup>7</sup> Die validierten Daten für 132 Verbindungen gegenüber Exon20-mutiertem Her2 sind in Abbildung 24a und Tabelle 20 dargestellt, wobei ähnliche Verbindungen mittels SARanea<sup>[154]</sup> zu Clustern zusammengefasst sind. Besonders hohe biochemische Potenz wurde dabei für Cluster gefunden, die durch die Verbindungen **i–v** repräsentiert werden. Diese zeichnen sich durch hydrophobe, sterisch anspruchsvolle Anilin-Gruppen aus, welche Verbindungen wie Lapatinib oder Neratinib ähneln und eine Sub-Tasche der inaktiven Kinase-Domäne besetzen. Des Weiteren wurden Typ II und Typ III Inhibitoren der p38-Kinase **vi–viii** gefunden. Interessant ist an der Stelle die Ähnlichkeit des Bindungsmodus der Verbindung **vii** zum allosterischen EGFR-Inhibitor EAI045. Beide weisen Substituenten auf, welche die drei Kavitäten der Bindetasche besetzen, während beschriebene Typ II EGFR Inhibitoren lediglich zwei dieser Kavitäten besetzen (Abbildung 24b). Verbindungen **ix** und **x** zeigten inhibitorische Aktivitäten im mikromolaren Bereich und ähneln teilweise den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren. Diese weisen ebenfalls eine Phenyl-Gruppe als Anker für die Orientierung in der Bindetasche auf und die Pyrimidin-Amin-Einheit ist vergleichbar mit dem Linker des Acrylamids. Jedoch weisen diese Pyrazolo[1,5-*b*]pyridazin-Grundgerüste keinen H-Brücken-Donor, sondern zwei Akzeptoren für den Kontakt zur Scharnier-Region auf. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden die zuvor als sehr vielversprechende Inhibitoren vorgestellten kovalenten Pyrrolopyrimidine mit den hier gefundenen hydrophoben Elementen kombiniert, sowie Hybrid-Moleküle mit den Typ III-Inhibitoren entworfen, synthetisiert und getestet.

<sup>7</sup> Aufsetzen des Screens und erste Testung durch: C. Becker im Rahmen seiner Dissertation,<sup>[134]</sup>  
Durchführung des Screens und  $IC_{50}$ -Bestimmung durch: S. Eppmann (AG D. Rauh, TU Dortmund)

a)



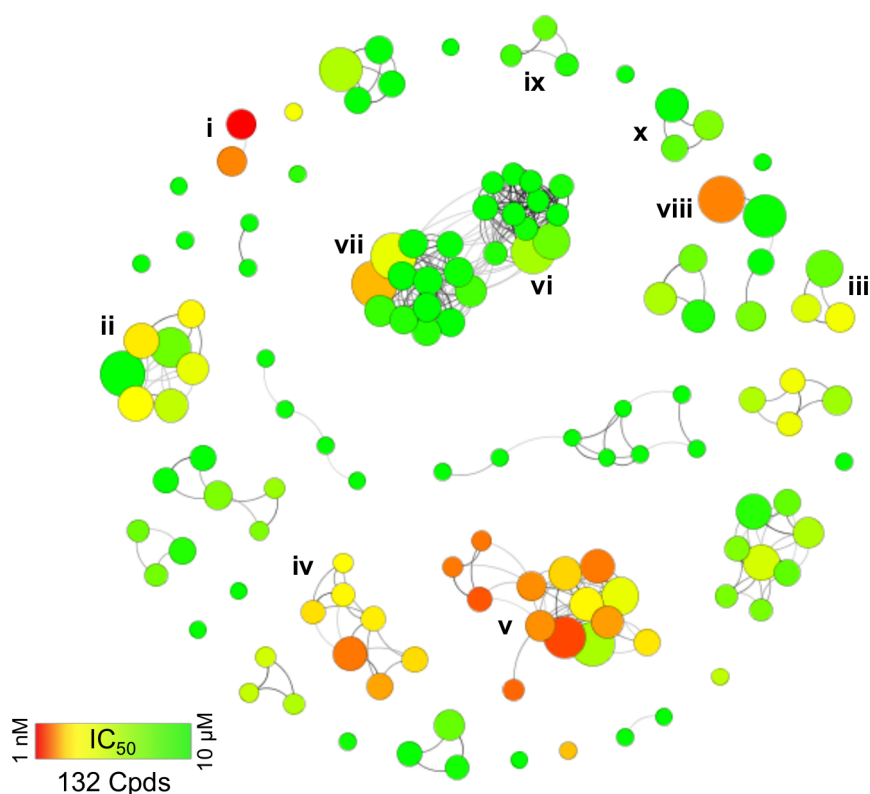
b)



**Abbildung 24. a)** Repräsentative Strukturen validierter Hits des biochemischen Her2-Screens. **b)** Überlagerung des Bindungsmodus von Lapatinib und EAI001 in EGFR, sowie der Verbindung **vii** in p38 $\alpha$  (PDB IDs: 1XKK, 5D41, 3LFB).



**Tabelle 20.** Clustering chemisch ähnlicher Verbindungen mittels SARanea und biochemische Daten der validierten Hits des biochemischen Her2-Screens (die zugehörigen Strukturen sind Abb. 24 zu entnehmen).

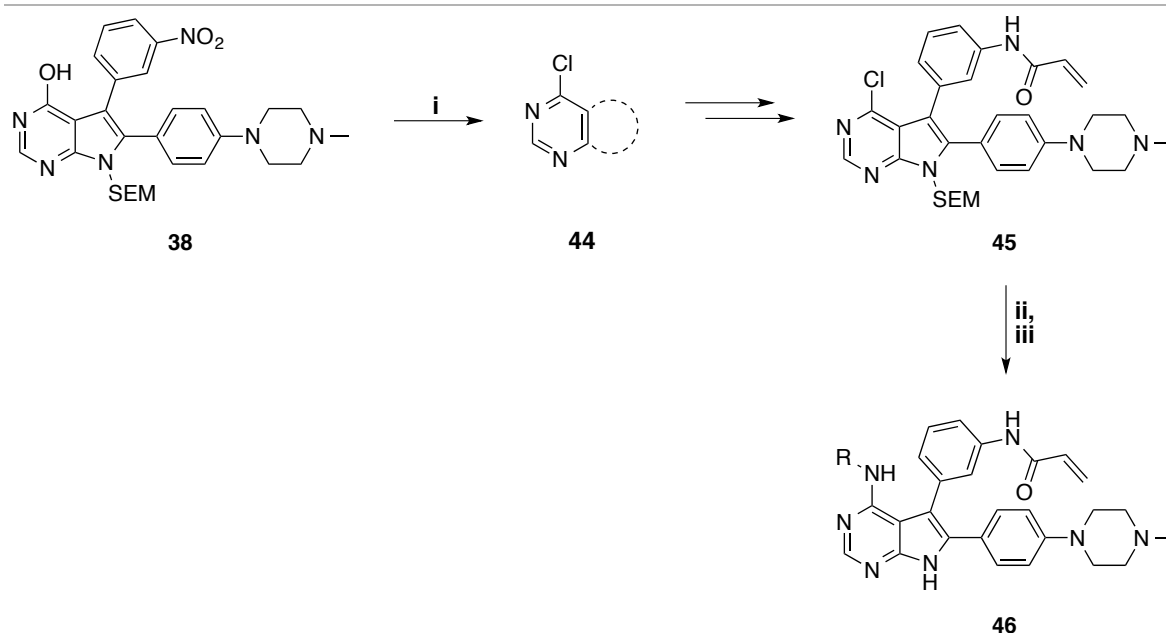


Cpd	Her2-wt HTRF	Her2-insYVMA HTRF
	% Restaktivität @ 10 $\mu$ M	% Restaktivität @ 10 $\mu$ M
	% Restaktivität @ 1 $\mu$ M IC <sub>50</sub> [nM]	% Restaktivität @ 1 $\mu$ M IC <sub>50</sub> [nM]
i	11	24
	14	30
	66 $\pm$ 27	0,4 $\pm$ 0,4
ii	12	23
	45	42
	279 $\pm$ 62	73 $\pm$ 22
iii	11	21
	68	40
	826 $\pm$ 160	118 $\pm$ 15
iv	12	25
	42	40
	548 $\pm$ 244	9,4 $\pm$ 2,8
v	12	23
	15	33
	95 $\pm$ 24	3,7 $\pm$ 2,2
vi	81	19
	98	91
	4100 $\pm$ 1500	501 $\pm$ 129

Cpd	Her2-wt HTRF	Her2-insYVMA HTRF
	% Restaktivität @ 10 $\mu$ M % Restaktivität @ 1 $\mu$ M IC <sub>50</sub> [nM]	% Restaktivität @ 10 $\mu$ M % Restaktivität @ 1 $\mu$ M IC <sub>50</sub> [nM]
vii	74	19
	92	50
	8600 $\pm$ 1100	35 $\pm$ 18
viii	17	19
	91	51
	405 $\pm$ 382	20 $\pm$ 14
ix	40	33
	88	74
	3400 $\pm$ 650	1800 $\pm$ 210
x	16	31
	67	64
	1000 $\pm$ 260	1000 $\pm$ 20
Nera- tinib	17	37
	16	42
	25 $\pm$ 11	0,6 $\pm$ 0,3

Es wurde eine Syntheseroute zur Darstellung der Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit 4-Anilin-Substituenten etabliert (Schema 3).<sup>¶,##</sup> Ein kritischer Schritt, welcher einige Optimierungs-Arbeit erforderte, war die Aktivierung der 4-OH-Position der Verbindung **38**. Dabei konnte keine erfolgreiche Aktivierung mit Mesylchlorid oder *para*-Toluolsulfonsäurechlorid durchgeführt werden und Kupplungsreagenzien, wie das Phosphonium-Salz pyBOP, ließen sich durch das Anilin nicht substituieren. Die Chlorierung der Position mit Phosphoryl- oder Thionylchlorid zeigte keinen Umsatz, jedoch ermöglichte der Einsatz des Phasentransferkatalysators *N*-Benzyl-*N,N,N*-triethylammoniumchlorid die Chlorierung mit POCl<sub>3</sub> in *N,N*-Dimethylacetamid und lieferte Verbindung **44**.<sup>[143,145]</sup> Die Nitro-Gruppe dieser Verbindung wurde reduziert und das Acrylamid wie zuvor beschrieben eingeführt. Die Substitution durch das Anilin erfolgte säurekatalysiert in *n*-Butanol, wobei über-stöchiometrische Mengen Salzsäure eingesetzt werden mussten, um das basische Methypiperazin abzusättigen. Anschließende Entschützung resultierte in den finalen Verbindungen **46**.

<sup>¶,##</sup> Synthese der Verbindungen durch: P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit,<sup>[143]</sup> T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[145]</sup> und J. Lategahn



**Schema 3.** Synthese von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit hydrophoben, sterisch anspruchsvollen Anilin-Substituenten. Reaktionsbedingungen: **(i)** POCl<sub>3</sub>, BnEt<sub>3</sub>NCl, DMA, MeCN, 85 °C, 2 h, 92%; **(ii)** NHR, HCl (1.25 eq.), *n*BuOH, 80 °C, 72 h; **(iii)** TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3), RT, dann NaOH:THF (1:1), RT.

Die Synthese der hydrophoben Anilin-Derivate erfolgte durch einfache Alkylierungsreaktionen mit *para*-Nitrophenolen und milde Reduktion zum Anilin. Weiterhin stellte sich die S<sub>N</sub>Ar-Reaktion von *para*-Fluornitrobenzol mit Alkoholen als gute Alternative heraus. Die Anilin-Einheit der Verbindung **46d** wurde aus Isoindolinon, welches mit Formaldehyd umgesetzt und anschließend mit Thionylchlorid behandelt wurde, erhalten. Das so generierte Chlorid konnte mit *para*-Nitrophenol umgesetzt und anschließend reduziert werden. Die hydrophoben Elemente der Verbindungen **46f** und **46g** wurden aus Phthaldialdehyd und der Aminosäure Phenylglycin synthetisiert, welches mit SOCl<sub>2</sub> zum Säurechlorid umgesetzt wurde und so an *para*-Nitroanilin oder *para*-Nitrophenol gekuppelt werden konnte. Je nach Säure-/Base-Stabilität der Anilin-Einheiten wurde die Reihenfolge von Kupplung und Entschützung umgekehrt oder mildere Reaktionsbedingungen mit TBAF bei vermindertem Druck zur Spaltung der Schutzgruppe verwendet.<sup>[145]</sup>

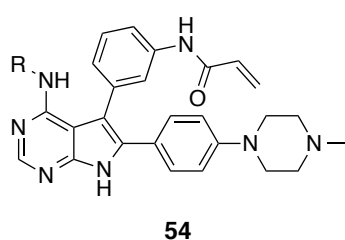
Die so erhaltenen Inhibitoren wurden anschließend biochemisch und zellulär charakterisiert (Tabelle 21).<sup>†,‡</sup> Die Verbindungen **46a** und **46b** tragen das hydrophobe Element von Lapatinib bzw. Neratinib, welche sich durch einen benzylistischen *meta*-Fluorophenyl bzw. 2-Pyridinyl-Substituenten unterscheiden.

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

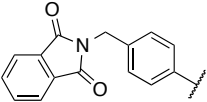
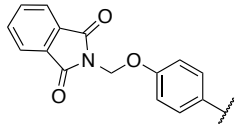
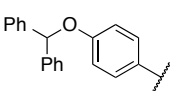
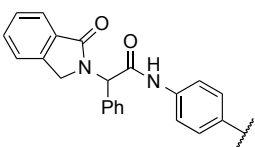
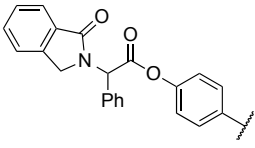
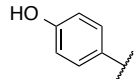
<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien A431 und H1781 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

Interessanterweise bewirkt das Stickstoff-Heteroatom der Verbindung **46b** verglichen mit **46a** einen 10-fachen Aktivitäts-Gewinn gegenüber der YVMA-Insertionsmutante des Her2. Dieser Effekt ist ebenfalls im zellulären Modellsystem stark ausgeprägt, wobei die verwendeten H1781 Zellen eine Her2-G776delinsVC Mutation tragen und die verwendeten Ba/F3 Zellen die Her2-Insertion aufweisen. Für Verbindung **46a** wurde ein schwacher inhibitorischer Effekt im mikromolaren Bereich festgestellt, während der Inhibitor **46b** eine halbmaximale Inhibition zwischen 200 und 400 nM in beiden Zelllinien aufwies. Dieser liegt damit nur knapp über dem EC<sub>50</sub> von Neratinib selbst (H1781 EC<sub>50</sub> = 122 nM). Es lässt sich vermuten, dass die hohe Hydrophobizität der Inhibitoren einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Potenz vermittelt und deren Verminderung in potenteren Inhibitoren resultiert. Der Vergleich der getesteten Verbindung **46c–46e** zeigt ebenfalls, dass die lipophile Verbindung **46e** nur einen schwachen zellulären Effekt über 5,6 µM aufweist, während **46d** einen Effekt von etwa 1,4 µM zeigt. Verbindung **46f** stellt einen Hybrid-Inhibitor zwischen EAI045 und den Pyrrolopyrimidinen dar, jedoch zeigt dieses ebenfalls nur einen schwachen inhibitorischen Effekt in Zellen (H1781 EC<sub>50</sub> = 7,4 µM). Vermutlich erschwert das hohe Molekulargewicht von knapp 800 Da eine Aufnahme in die Krebszellen. Der intensive Effekt von **46g** wird vermutlich durch das von zellulären Esterasen gespaltene zytotoxische *para*-Phenol **46h** vermittelt.

**Tabelle 21.** Biochemische und zelluläre Evaluation des ersten Sets von Her2-gerichteten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.



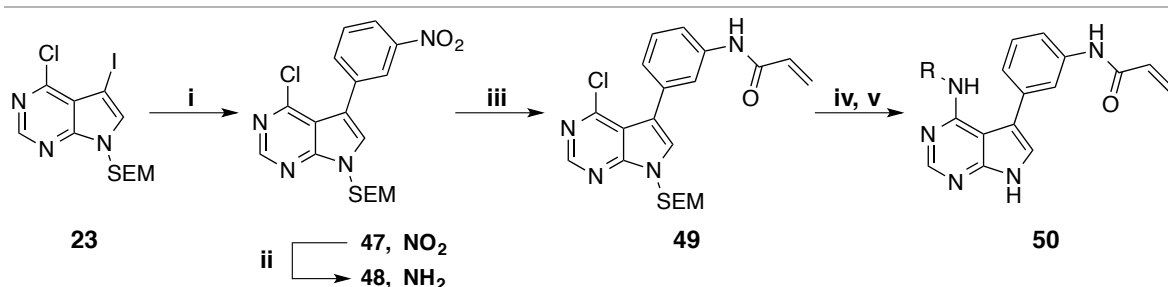
Cpd	R	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
<b>46a</b>		73 ± 57 3,3 ± 1,6	>30000 4100 ± 1300	21000 ± 6200 8000 ± 3200
<b>46b</b>		14 ± 1 0,3 ± 0,1	361 ± 226 226 ± 124	2300 ± 1300 760 ± 477

Cpd	R	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
46c		35 <sup>a</sup> 7,6 <sup>a</sup>	6100 ± 5300 599 ± 95	25000 ± 5800 1100 ± 530
46d		12 ± 1,2 0,6 ± 0,1	1400 ± 900 1400 ± 940	1800 ± 1200 992 ± 441
46e		4,5 ± 0,2 0,8 ± 0,7	5600 ± 1600 5800 ± 3600	12000 ± 3400 12000 ± 8100
46f		38 <sup>a</sup> n.b.	7400 ± 1800 5700 ± 4800	2600 ± 3100 6000 ± 2700
46g		13 ± 3 n.b.	1200 ± 510 637 ± 234	1300 ± 940 6400 ± 4200
46h		3,9 ± 0,1 <0,1	749 ± 804 431 ± 102	613 ± 209 289 ± 64
Afa- tinib	-	7,7 ± 4,5 0,6 ± 0,3	174 ± 83 <14	634 ± 312 820 ± 505
Nera- tinib	-	25 ± 11 0,6 ± 0,3	122 ± 45 9 ± 4	630 ± 801 422 ± 207
Osi- mer- tinib	-	4,8 ± 0,1 3,2 ± 0,1	461 ± 222 365 ± 329	756 ± 340 1300 ± 950

<sup>a</sup>Einfachbestimmung, n.b. = nicht bestimmt

Für einige Verbindungen dieser Serie wurde eine erhöhte Inhibition von A431 EGFR-WT Zellen bei etwa 2 µM festgestellt und EC<sub>50</sub>-Werte von unter 1 µM gegenüber SCCNC4 Zellen. Diese tragen zwar eine EGFR-Mutation in Exon20 (D770\_N771insSVD), jedoch ist es Bestandteil aktueller Untersuchungen ob diese Zellen von einem EGFR-Signal abhängig sind und in wie fern ein spezifischer Effekt mit EGFR-Inhibition erzielt werden kann. Diese Arbeit soll den verfügbaren Datensatz erweitern und so zur Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser

Zelllinie beitragen. Durch die ausgeprägte Inhibition des EGFR wurde vermutet, dass durch das Ersetzen der für EGFR optimierten Methylpiperazin-Gruppe Her2-selektive Inhibitoren liefert und daher wurden die Verbindungen **50** entworfen. Diese weisen keine Substitution in 6-Position auf und sollen durch das hydrophobe Element in der Bindetasche ausgerichtet werden, welche im Gegensatz zu Verbindung **32** weder in 6-Position, noch mit sterisch anspruchsvollen Gruppen in 4-Position dekoriert war. Die Synthese war ausgehend von Verbindung **23** möglich, die unter milden Bedingungen in einer Suzuki-Kupplung selektiv am 5-Iod substituiert werden konnte und weiter zur Verbindung **49** umgesetzt wurde. Diese konnte dann mit Anilinen substituiert und entschützt werden um die finalen Verbindungen **50** zu erhalten (Schema 4).<sup>¶,##</sup>



**Schema 4.** Synthese von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit hydrophoben, sterisch anspruchsvollen Anilin-Substituenten. Reaktionsbedingungen: **(i)** *meta*-Nitrophenylboronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1), 75 °C, 24 h, 56%; **(ii)** Eisenpulver, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1), 60 °C, Ultraschallbehandlung, 2 h, 92%; **(iii)** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 3 h, 83%; **(iv)** RNH<sub>2</sub>, HCl (kat.), *n*BuOH, 80 °C, 72 h; **(v)** TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3), RT, dann NaOH:THF (1:1), RT.

Die so erhaltenen Verbindungen wurden anschließend im Kontext von Her2 und EGFR-Inhibition Charakterisiert (Tabelle 22).<sup>†,‡</sup> Generell unterliegen die Daten der Her2-Assays einer vergleichsweise hohen Schwankung, vermutlich auch bedingt durch den lipophilen Charakter der Verbindungen. Dennoch lässt sich eine gewisse Steigerung der zellulären Aktivität der Verbindungen **50** im Vergleich zu **46** ableiten. Tendenziell zeigt sich auch ein leicht reduzierter Effekt gegenüber EGFR-bezogenen Zellen. Die Viabilität von SCCNC4 Zellen wurde erst bei Konzentrationen von über 1,9 µM beeinflusst.

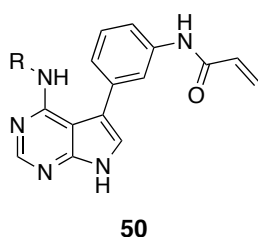
<sup>¶,##</sup> Synthese der Verbindungen durch P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit,<sup>[143]</sup> T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[145]</sup> und J. Latégahn

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien A431 und H1781 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

Ein ausgeprägter inhibitorischer Effekt wurde für Verbindung **50b** gegenüber H1781 Zellen festgestellt, mit einem  $EC_{50}$  von 168 nM. Weitere potente Inhibitoren wurden mit 5-Aminoindol-basierten Inhibitoren **50c–50e** identifiziert, welche ebenfalls im biochemischen Screen aufgefallen waren (Verbindungen **i** und **iv**; Abbildung 24). Davon stach Verbindung **50e** mit einem 2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin-Substituenten heraus und zeigte hohe biochemische Potenz, sowie zelluläre  $EC_{50}$ -Werte zwischen 250 und 400 nM. Im Weiteren wurde beobachtet, dass Verbindung **50f** vermutlich zu unpolar ist um effiziente Inhibition der H1781 Zellen zu erreichen ( $EC_{50}$  = 5,4  $\mu$ M), während die Einbringung eines einzelnen Sauerstoff-Heteroatoms in Verbindung **50g** den inhibitorischen Effekt um das 2-Fache erhöht ( $EC_{50}$  = 2,4  $\mu$ M). Durch Entfernen der Löslichkeitsgruppe wurde ebenfalls die Potenz der Verbindungen **50h–50i** im Vergleich zu **46c–46d** deutlich gesteigert. Dabei zeigen die Verbindungen **50h** und **50i** beachtliche  $EC_{50}$ -Werte von 406 bzw. 861 nM.

**Tabelle 22.** Biochemische und zelluläre Evaluation des zweiten Sets von Her2-gerichteten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.



Cpd	R	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
<b>50a</b>		12 ± 5 <0,1	382 ± 205 129 ± 74	3300 ± 1600 4100 ± 2300
<b>50b</b>		9,3 ± 4,9 <0,1	168 ± 73 142 ± 117	1700 ± 280 1900 ± 1600
<b>50c</b>		7,9 ± 1,0 0,4 ± 0,0	778 ± 528 209 ± 122	3000 ± 490 4100 ± 1300
<b>50d</b>		39 ± 20 n.b.	502 <sup>a</sup> 202 ± 237	1300 ± 940 5100 ± 2700

Cpd	R	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
50e		3,5 ± 1,7 n.b.	246 ± 86 385 ± 208	1800 ± 660 6400 ± 1300
50f		29 ± 6 2,2 ± 0,3	5400 ± 2800 2900 ± 1200	20000 ± 1400 20000 ± 7500
50g		13 ± 3 0,8 ± 0,1	2400 ± 1400 1100 ± 470	9000 ± 2100 13000 ± 1600
50h		5600 <sup>a</sup> 0,2 ± 0,2	406 ± 289 226 <sup>a</sup>	1600 ± 630 3700 ± 110
50i		4,5 ± 0,6 0,2 ± 0,2	861 ± 512 1200 ± 240	4700 ± 1400 24000 ± 8300
50j		26 ± 112 3,1 ± 0,3	6400 ± 1900 980 ± 609	16000 ± 2700 >30000

<sup>a</sup>Einfachbestimmung, n.b. = nicht bestimmt

Die bisher angestellten Überlegungen, kovalente Pyrrolopyrimidin-basierte Her2-Inhibitoren mit sterisch anspruchsvollen, hydrophoben Elementen zu kombinieren und dabei die Methylpiperazin-Gruppe zu entfernen resultierte in potenten Verbindungen **50**, welche die Viabilität von Her2-mutierten H1781 Krebszellen effizient inhibierten. Gleichzeitig wurde jedoch vermutet, dass die Erhöhung der Polarität der Verbindungen für eine effektive zelluläre Potenz nötig ist. Es wurden daher erste Studien durchgeführt, um neue Positionen zur Einführung von Löslichkeits-vermittelnden Gruppen zu identifizieren. Dazu wurde die zuvor beschriebenen Verbindung **33a** untersucht, sowie Verbindungen **33c**, **54a** und **54b** synthetisiert (Schema 1 und Schema 5a) und Charakterisiert (Tabelle 23).<sup>††,†,‡</sup> Diese weisen Ethylenglycolether-abgeleitete Seitenketten in *para*-Position des 5-Phenyl-Linkers auf, bzw. wurden als Substituent des Acrylamid-Stickstoffs eingeführt. Dabei zeigten die Verbindungen **33a** und **33c** eine leicht erhöhte

<sup>††</sup> Synthese der Verbindungen durch: L. Hodson (AG W. van Otterlo, Universität Stellenbosch, Südafrika) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes (AG D. Rauh, TU Dortmund)

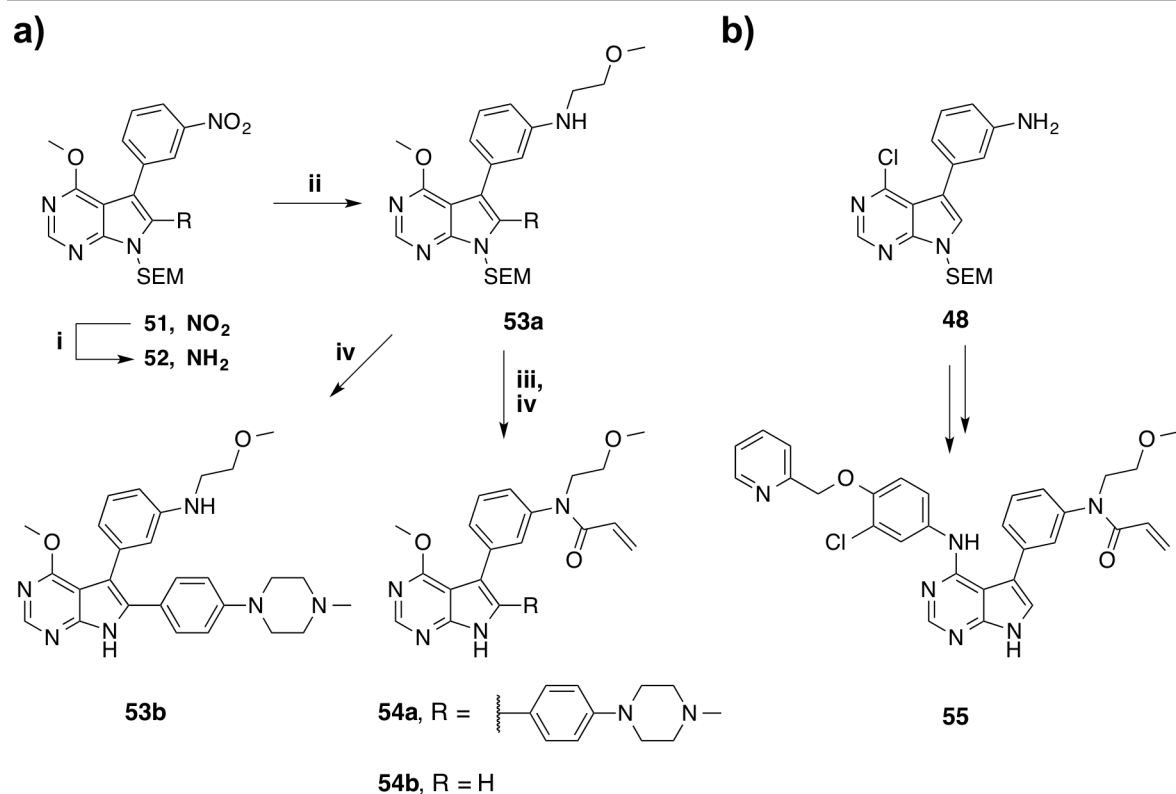
<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien A431 und H1781 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>



biochemische inhibitorische Potenz gegenüber Her2-insYVMA, verglichen mit der unsubstituierten Verbindung **31a**, während auf zellulärer Ebene etwa vergleichbare  $EC_{50}$ -Werte zwischen 260 und 400 nM bestimmt wurden. Generell werden diese Gruppen also in diesen Positionen im Kontext von Her2-mutierten Zellen toleriert. Die Verbindungen **54a** und **54b** weisen keine Substitution der 6-Position auf, zeigten deutliche Einbuße an Aktivität und einen Verlust der zellulären Potenz. Die eingeführten Glycol-Einheiten eignen sich also nicht als Ersatz für die Methylpiperazin-Gruppe in 6-Position unter Erhalt der inhibitorischen Potenz und kann die Orientierung dieser Verbindungen in der Bindetasche nicht vermitteln. Verbindung **55** wurde analog synthetisiert (Schema 5b) und weist ein sterisch anspruchsvolles hydrophobes Element auf, welches die korrekte Orientierung des Grundgerüsts bewirkt. Diese ist darüber hinaus am anilinischen Acrylamid-NH mit einem Ethylenmethylether versehen, jedoch liegt der inhibitorische Effekt gegenüber H1781 Zellen im mikromolaren Bereich. In zukünftigen Arbeiten sollten polare Gruppen an diesen Positionen eingeführt und getestet werden, welche in Kombination mit hydrophoben Elementen in 4-Position Inhibitoren mit gesteigerter zellulärer Potenz gegenüber Her2-Mutanten liefern könnten.

Zusammenfassend wurden hier potente Inhibitoren des Her2 vorgestellt, welche durch einen biochemischen Screen inspiriert wurden. Es wurden neue hydrophobe Elemente entworfen, synthetisiert und getestet, sowie mögliche Substitutions-Stellen für die Einführung von polaren, Löslichkeits-vermittelnden Gruppen identifiziert. Durch diese Arbeiten wurde das Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst als Grundstruktur für kovalente Her2-Inhibitoren weiter etabliert.



**Scheme 5.** Synthese von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren mit **a)** Ethylenglycol-Einheiten und **b)** hydrophoben, sterisch anspruchsvollen Anilin-Substituenten. Reaktionsbedingungen: **(i)** Eisenpulver,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , EtOH, 60 °C, Ultraschallbehandlung, 2 h, 93%; **(ii)**  $p\text{-TsO}(\text{CH}_2)_2\text{OMe}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, DMF, 75 °C, 24-72 h, 36-65% (79-90% BRSM); **(iii)** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 3 h, 61-67%; **(iv)** TFA: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:3), RT, dann NaOH:THF (1:1), RT, 73-79% über zwei Schritte.

**Tabelle 23.** Biochemische und zelluläre Evaluation des dritten Sets von Her2-gerichteten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

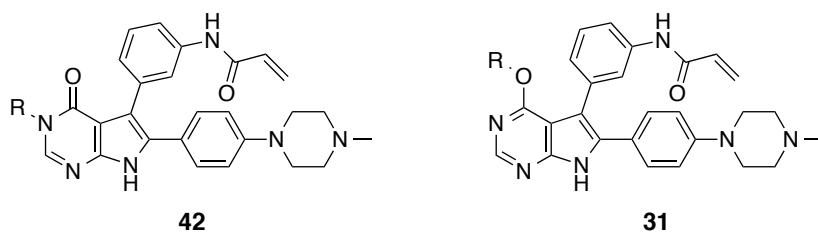
Cpd	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
<b>31a</b>	14 ± 7 4,8 ± 2,6	357 ± 92 299 ± 29	638 ± 247 834 ± 96
<b>33a</b>	42 ± 17 1,2 ± 0,1	694 ± 459 340 ± 194	27000 ± 5100 1800 ± 2000
<b>54a</b>	17 ± 7 2,9 ± 0,2	342 ± 121 260 ± 73	579 ± 156 1000 ± 520
<b>33c</b>	2100 ± 260 704 ± 145	20000 ± 13000 30000 ± 180	>30000 >30000
<b>54b</b>	552 ± 207 561 ± 76	>30000 13000 ± 4100	26000 ± 6800 >30000
<b>55</b>	27 ± 5 n.b.	4900 ± 3400 479 ± 359	17000 ± 14000 18000 ± 17000

### 3.3.2. Potential von Pyrrolopyrimidin-basierten TKIs gegenüber Exon20-Mutanten

Abschließend wurde ein Sub-Set der bereits vorgestellten *N*- und *O*-alkylierten Verbindungen **42** und **31** gegenüber Mutanten des Her2, sowie in den Exon20-mutierten SCCNC4 Zellen getestet (Tabelle 24).<sup>†,‡</sup> Im Kontext von T790M-mutiertem EGFR zeigten beide Verbindungs-Klassen potente biochemische und zelluläre Aktivitäten, obwohl für *N*-alkylierte Verbindungen **42** eine gewisse sterische Repulsion mit der Methionin-Seitenkette festgestellt wurde, welche vermutlich durch kovalente Bindung des Rezeptors kompensiert werden konnte. Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen den beiden substituierten Pyrrolopyrimidinen gegenüber Her2, welches eine Threonin Türsteher-Aminosäure aufweist, sehr stark ausgeprägt. Die getesteten *N*-substituierten Pyrrolopyrimidin-4-one **42a–42b** und **42g–h** zeigen biochemische IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 30 und 600 nM und zelluläre EC<sub>50</sub>-Werte von über 2,2 µM, während *O*-funktionalisierte Pyrrolopyrimidine **31a**, **31c** und **31g–31h** nanomolare IC<sub>50</sub>-Werte unter 21 nM und zelluläre Aktivitäten unter 1,2 µM aufwiesen. Mögliche Erklärungen beinhalten eine erhöhte Abstoßung der unpolaren Alkyl-Ketten mit dem im Vergleich zum Methionin polareren Threonin. Dafür spricht auch die für *N*-alkylierte Verbindungen teilweise festgestellte erhöhte Potenz gegenüber EGFR Wild-Typ (Tabelle 15). Hinzukommen könnte eine im Vergleich zu EGFR weniger effiziente Alkylierung des Cys805 des Her2. Eine detaillierte Untersuchung der Bindungs-Charakteristik in Her2, könnte hier weitere Einblicke liefern. Des Weiteren fällt für die Verbindungen ein vergleichsweise hoher Effekt gegenüber der Viabilität von SCCNC4 Zellen auf und so könnten diese Verbindungen als Sonden für weitere Analysen im Kontext von Exon20-mutiertem EGFR fungieren und zur Aufklärung der Eigenschaften dieser Zelllinie beitragen. Generell wurden EC<sub>50</sub>-Werte von höchstens 600 nM nachgewiesen und könnten die Hypothese einer heterogenen Zell-Population mit teilweise unterschiedlichen molekularen Eigenschaften weiter stützen.

<sup>†</sup> Biochemische Charakterisierung durch: S. Eppmann, A. Arndt (AG D. Rauh, TU Dortmund)

<sup>‡</sup> Validierung der zellulären Charakterisierung, sowie Charakterisierung der Zelllinien A431 und H1781 durch: H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit<sup>[102]</sup>

**Tabelle 24.** Biochemische und zelluläre Evaluation von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren im Kontext von Exon20-mutiertem Her2 bzw. EGFR.

Cpd	R	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]	Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	EGFR CTG EC <sub>50</sub> [nM]
		WT insYVMA	H1781 Ba/F3(insYVMA)	A431 SCCNC4
42a		146 ± 84 45 ± 3	4700 ± 3200 6000 ± 1700	1100 ± 350 3100 ± 1700
42b		84 ± 21 27 ± 11	2300 ± 290 3100 ± 1400	739 ± 287 631 ± 245
42g		592 ± 99 146 ± 21	6500 ± 4600 3800 ± 1800	1400 ± 920 825 ± 246
42h		321 ± 138 83 ± 13	2200 ± 1400 4600 ± 2900	1100 ± 510 3300 ± 1900
31a		14 ± 7 4,8 ± 2,6	357 ± 92 299 ± 29	638 ± 247 834 ± 96
31c		14 ± 1 2,3 ± 1,0	657 ± 331 327 ± 160	759 ± 394 708 ± 333
31g		21 ± 3 3,0 ± 1,5	1200 ± 440 278 ± 183	334 ± 50 896 ± 712
31h		15 ± 0 3,0 ± 0,0	543 ± 398 179 ± 96	1700 ± 400 5400 ± 2400

## 4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Inhibitoren von mutierten Varianten der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR und Her2 evaluiert und weiterentwickelt. Diese Zielproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Lungenkrebs und können mit niedermolekularen Wirkstoffen inhibiert werden. Dazu wurden Viabilitäts-Assays für elf Krebs-Zelllinien etabliert und erlaubten in Kombination mit biochemischen Aktivitäts-basierten Assays die Bewertung mehrerer Serien an Inhibitoren der ErbB-Kinasen. Zusätzliche Informationen zu den Bindungscharakteristiken konnten durch Komplexstrukturen mit den jeweiligen Zielproteinen, sowie durch Auswertung der Bindungskinetiken erhalten werden.

Anhand einer Serie von Aminopyrazolopyrimidin-basierten TKIs wurden die Voraussetzungen für die nächste Generation an Wirkstoffen identifiziert, welche die EGFR-Mutationsvariante T790M/C797S ebenfalls effizient inhibieren sollen. Diese Wirkstoffe sollten drei entscheidende Faktoren für die Inhibition des EGFR-T790M aufweisen: Verwendung neuer Grundgerüste, Selektivität gegenüber Wild-Typ und kovalente Alkylierung von Cys797. Zusätzlich müssen diese eine hohe reversible Bindungs-Affinität für die Bindetasche aufweisen, um die C797S-mutierte Variante effektiv binden zu können, welche sich durch Analyse der Bindungskinetik bestimmen lässt. Analog wurde eine Serie von Aminoindazol-basierten TKIs analysiert, welche jedoch nur eine schwache Bindungsaffinität aufwies. Die hier getesteten Verbindungen sind für eine effiziente Bindung auf eine kovalente Alkylierung der Kinase angewiesen und eignen sich nicht für die Inhibition der Wirkstoff-resistenten Variante EGFR-C797S. Es wurden weiterhin Pyridinylimidazol-basierte Inhibitoren getestet, welche im Bezug auf ihre reversiblen Bindungs-Eigenschaften optimiert waren und wiesen hohe biochemische Potenz gegenüber Cys797-mutiertem EGFR auf. Diese resultierten jedoch aus *Target-Hopping* von Inhibitoren der Kinase p38 $\alpha$  und die enthaltenen Struktur motive zeigten sterische Abstoßung mit dem Methionin-Türsteher, sodass hier keine Selektivität gegenüber EGFR Wild-Typ nachgewiesen werden konnte. Selektivität gegenüber Wild-Typ, sowie effiziente Inhibition des EGFR-L858R/T790M wurde für eine Serie von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren gefunden, welche ebenfalls einen hohen reversiblen Bindungs-Charakter zeigten und die C797S-mutierte Variante auf biochemischem Level potent inhibierten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Syntheseroute für diese Serie mehrfach optimiert und eine Mitsunobu-basierte Derivatisierung angewendet, welche in einer leicht trennbaren Mischung von *O*-alkylierten Pyrrolopyrimidinen und *N*-alkylierten Pyrrolopyrimidin-4-onen resultierte. So wurden insgesamt 32 Verbindungen generiert und Verbindung **31h** wurde aufgrund ihrer hohen Potenz und vorteilhaften Eigenschaften *in vivo* getestet und zeigte ein gutes Plasma-Profil

nach intraperitonealer Verabreichung in Mäusen. Kristallisationsstudien erlaubten außerdem Einblicke in den Bindungsmodus dieser Verbindungsklasse und lieferten eine Erklärung für die unterschiedlichen inhibitorischen Eigenschaften der erhaltenen Konstitutionsisomere.

Die zelluläre Charakterisierung dieser Verbindungen in EGFR-C797S-mutierten Zellen zeigte, dass neben der Inhibition der Kinase-Aktivität weitere Faktoren eine Rolle spielen, um Wirksamkeit auf zellulärer Ebene erreichen zu können. Es wurde vermutet, dass eine optimale Zellgängigkeit ein zusätzliches nötiges Kriterium darstellt. Durch die Charakterisierung weiterer Verbindungen wurden Strukturelemente identifiziert, wie alternative Löslichkeits-vermittelnde Gruppen und Reste die anstelle des Acrylamids verwendet werden könnten, um die vielversprechenden Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren in zukünftigen Arbeiten weiter zu optimieren. Darüber hinaus wurden zwei literaturbekannte Inhibitoren mit sub-mikromolarer zellulärer Aktivität identifiziert, die einen weiteren Startpunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen darstellen können.

Weiterhin wurden in einer biochemischen Substanz-Durchmusterung hydrophobe sterisch anspruchsvolle Anilin-Einheiten als wichtiges Strukturmotiv für die Inhibition von Her2-A775\_G776insYVMA identifiziert. Diese wurden dann mit dem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst kombiniert, sowie hybrid-Moleküle mit allosterischen Inhibitoren dargestellt, um neue Inhibitoren zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die Löslichkeits-vermittelnde Methylpiperazin-Gruppe eine leicht gesteigerte inhibitorische Aktivität gegenüber EGFR bewirkte und für die Inhibition des Her2 nicht erforderlich ist. Die Ausrichtung des Grundgerüsts in der Bindetasche erfolgt hier durch die sperrigen Anilin-Substituenten. In der Bestrebung die Zellgängigkeit und Löslichkeit der hydrophoben Inhibitoren zu erhöhen wurden erste Arbeiten zur Identifikation von Positionen zur tolerierten Einführung von Löslichkeits-Gruppen durchgeführt. Dazu wurden am Acrylamid und dessen Linker Alkyl-Ketten mit Heteroatomen eingeführt, die zwar toleriert wurden, jedoch zeigten sie keine gesteigerte zelluläre Aktivität. In zukünftigen Arbeiten sollten in diesen Positionen polare Gruppen eingeführt und getestet werden.

Die Evaluation der EGFR-gerichteten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren gegenüber Exon20-mutiertem Her2 zeigte deutliche Unterschiede zwischen den *N*- bzw. *O*-alkylierten Konstitutionsisomeren, welche ausgeprägter ausfielen als im Kontext von EGFR. Als mögliche Ursachen wurde die Wechselwirkung der Inhibitoren mit der Türsteher-Seitenkette, sowie die Effizienz der Alkylierung des reaktiven Cys805 in Her2 diskutiert. Die zukünftige Untersuchung der Bindungskinetik könnte dazu detaillierte Einblicke in die Bindungscharakteristika liefern.

## 5. SUMMARY AND OUTLOOK

During the present work, inhibitors of mutant variants of the ErbB receptor tyrosine kinases EGFR and Her2 have been evaluated and developed further. These target proteins are involved in the onset and progression of non-small cell lung cancer and can be specifically targeted with small-molecule inhibitors. Therefore, cellular viability assays have been established for eleven cancer cell lines and combined with biochemical activity-based assays allowed for the assessment of multiple series of ErbB inhibitors. Additional information on their binding characteristics was gained by X-ray structure determinations as well as analysis of the binding kinetics.

Utilizing a series of aminopyrazolopyrimidine-based tyrosine kinase inhibitors (TKIs) the essential features for next-generation inhibitors were identified, which are required to inhibit the EGFR-T790M/C797S mutant as well. These agents should exhibit three key properties for the inhibition of EGFR-T790M: incorporation of novel core scaffolds, being selective over wild type and covalent alkylation of the reactive cysteine Cys797 within the active site. Moreover, a high degree of reversible binding contribution is required to bind the C797S mutant EGFR variant that can be determined by analysis of the binding kinetics. Similarly, a series of aminoindazole-based TKIs was analyzed, which revealed a low binding affinity. The herein tested compounds depend on the covalent bond formation with the target kinase and are ineffective in the context of EGFR-C797S. In addition, pyridinylimidazole-based inhibitors have been studied, that had optimized reversible binding properties and revealed potency in biochemical assays against Cys797 mutant EGFR. These resulted from a target hopping approach starting from p38 $\alpha$  inhibitors and the structural motifs incorporated showed steric repulsion with the Met790 side chain resulting in high wild type on-target toxicity. Selectivity over wild type, as well as efficient inhibition of EGFR-L858R/T790M was determined for a series of pyrrolopyrimidine-based inhibitors that exhibited a high degree of reversible binding and potent inhibition of the C797S mutant kinase. During this work, a synthetic route for this series was optimized and takes advantage of a Mitsunobu reaction-based derivatization that yielded a mixture of *O*-alkylated pyrrolopyrimidines and *N*-alkylated pyrrolopyrimidin-4-ones that can be easily separated. Thereby, total 32 compounds were generated, and inhibitor **31h** was further profiled *in vivo* due to its high potency and selectivity, which revealed a reasonable plasma profile after IP administration in mice. X-ray crystal structure determinations yielded insights into the binding mode of these compounds and provide an explanation the differential inhibitory capability of the constitution isomers.

Characterization of these compounds in EGFR-C797S mutated cells indicated that properties beyond kinase activity inhibition are involved in efficacious inhibition at the cellular level. It was assumed that further increased cellular membrane transition capabilities constitute an additional requirement for next-generation TKIs. By analyzing additional inhibitors, motifs such as alternate solubilizing groups as well as moieties that might replace the acrylamide, were identified in order to further optimize the promising pyrrolopyrimidine-based inhibitors in the future. Furthermore, two literature described inhibitors with sub-micromolar cellular potency were identified that might serve as additional starting point for drug development projects.

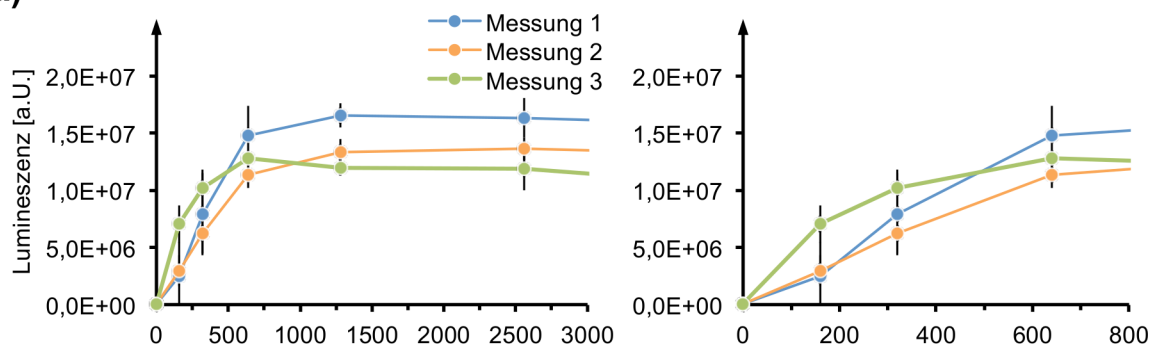
Furthermore, using a biochemical screening approach, hydrophobic aniline-based back-pocket elements were found to be an important motif for the inhibition of Her2-A775\_G776insYVMA. These were combined with the pyrrolopyrimidine scaffold, as well as hybrid molecules with allosteric inhibitors generated, in order to yield novel chemical entities. During the biochemical and cellular investigation of these inhibitors, it was observed that the methylpiperazine solubilizing group provoked slightly increased potency against EGFR and is not required for the inhibition of Her2. The alignment of the ligand in the binding site is mediated by the bulky aniline-substituents. Aiming at increasing the cellular potency and solubility of the hydrophobic inhibitors, studies towards the identification of tolerated positions for the introduction of solubilizing groups were performed. Therefore, the acrylamide and its linker were equipped with heteroatom containing alkyl chains, that were tolerated but did not elevate the potency against cancer cells. In the future, polar groups should be introduced and tested.

The pyrrolopyrimidine-based inhibitors were also profiled against exon20-mutant Her2 and revealed marked differences between the *N*- and *O*-alkylated constitution isomers, which were more pronounced as in EGFR. It was speculated, that the interaction with the gatekeeper side-chain or the efficiency of the alkylation of the reactive Cys805 in Her2 might play a role here. Analysis of the binding kinetics could yield detailed insights into the binding characteristics in future works.

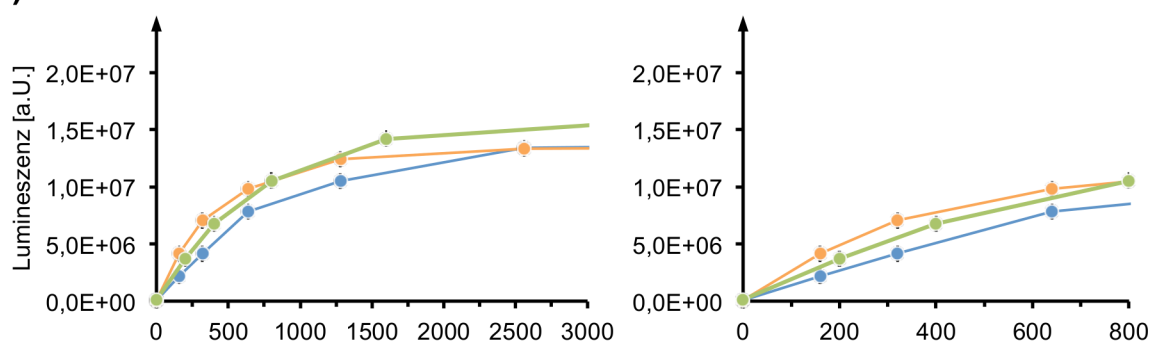


## 6. ANHANG

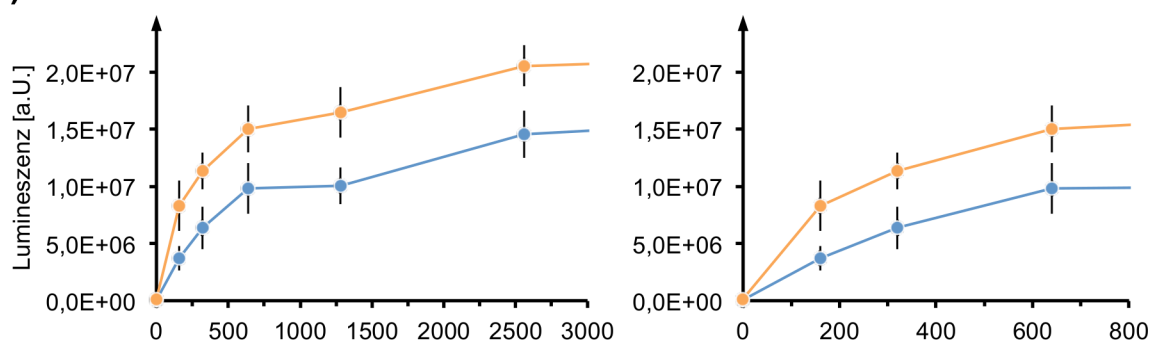
a)



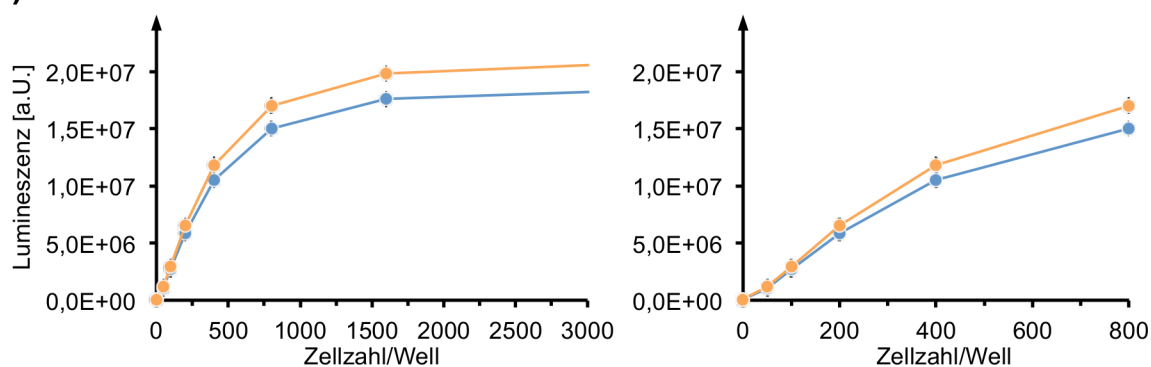
b)



c)

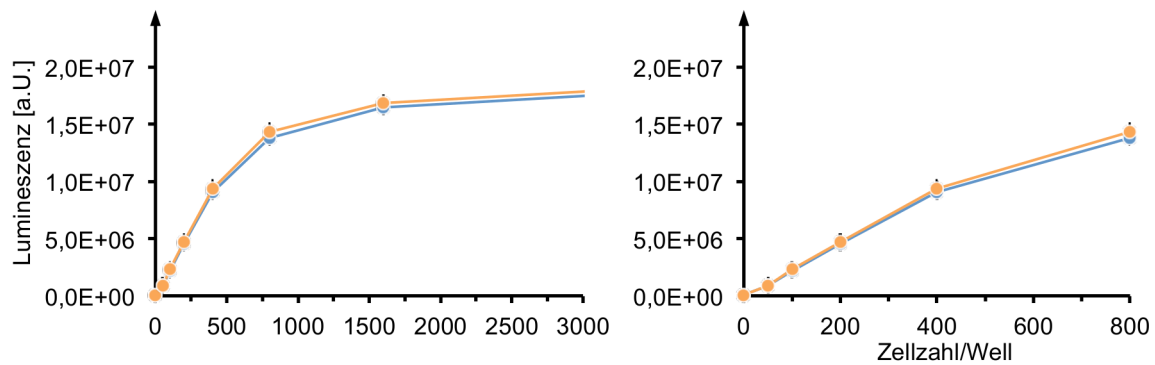


d)

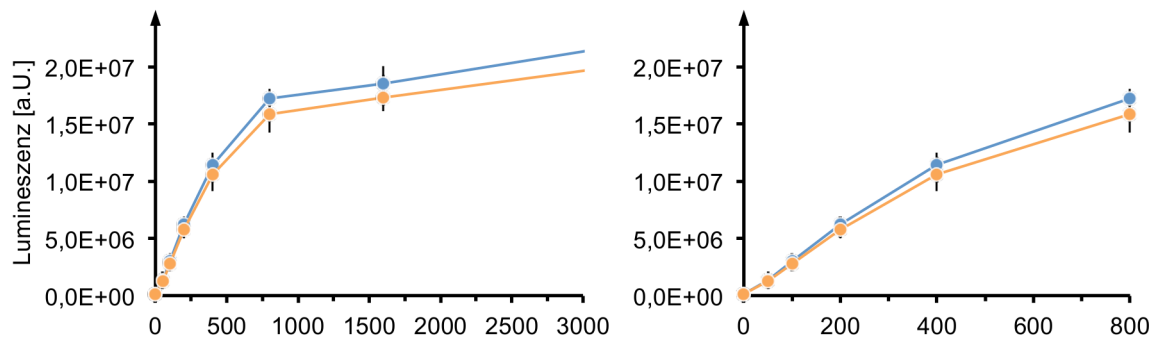


**Abbildung A1.** Ermittlung der zu verwendenden Zellzahl pro Well. Titration der Zellzahl und Auftragung gegen das erhaltene lumineszente Signal für die Zelllinien **a)** A431, **b)** HCC827, **c)** H1975, **d)** PC9.

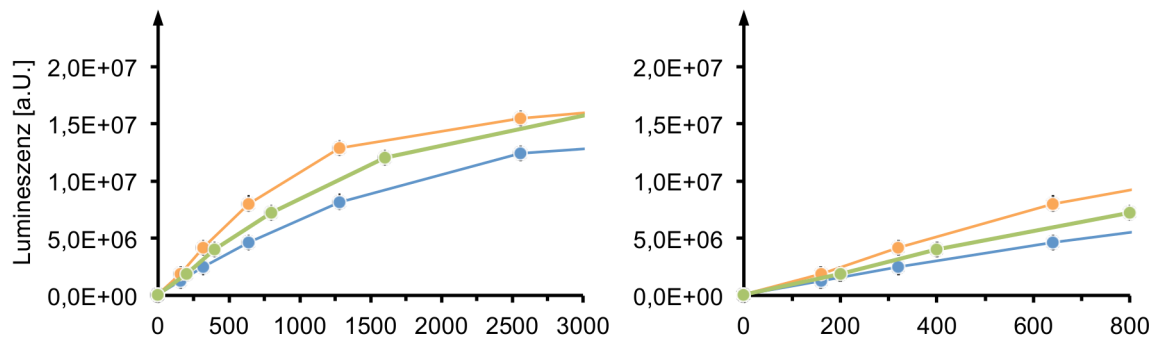
e)



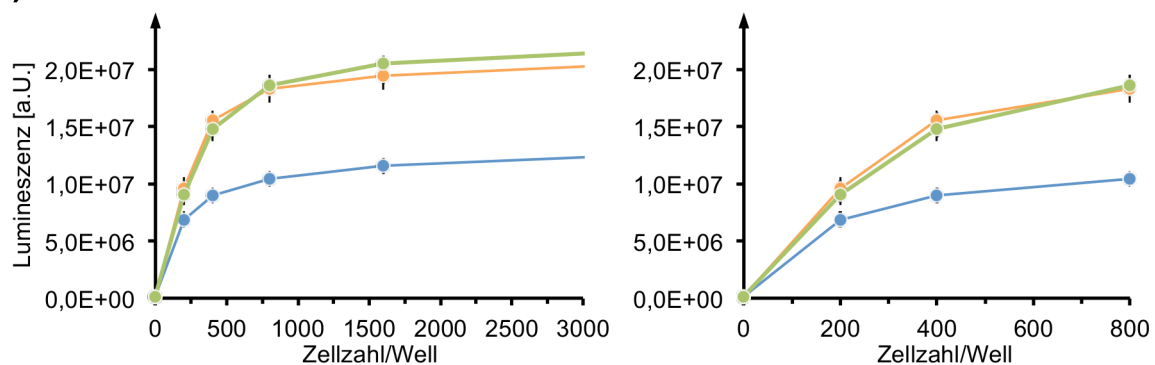
f)



g)

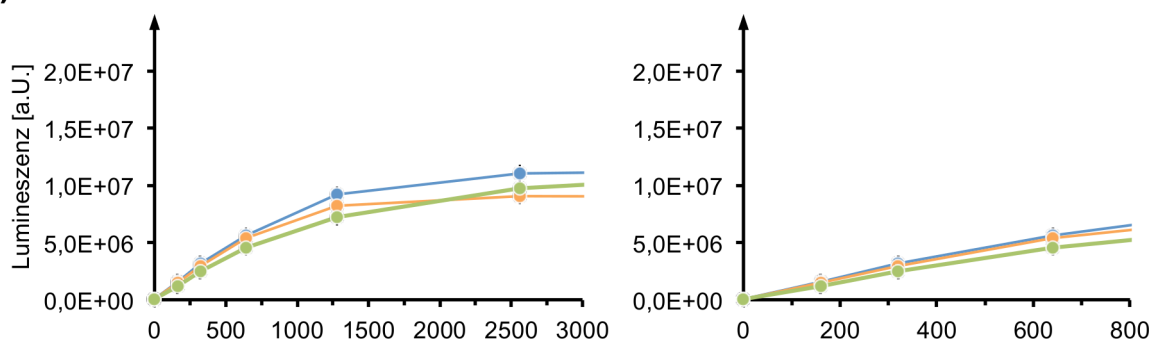


h)

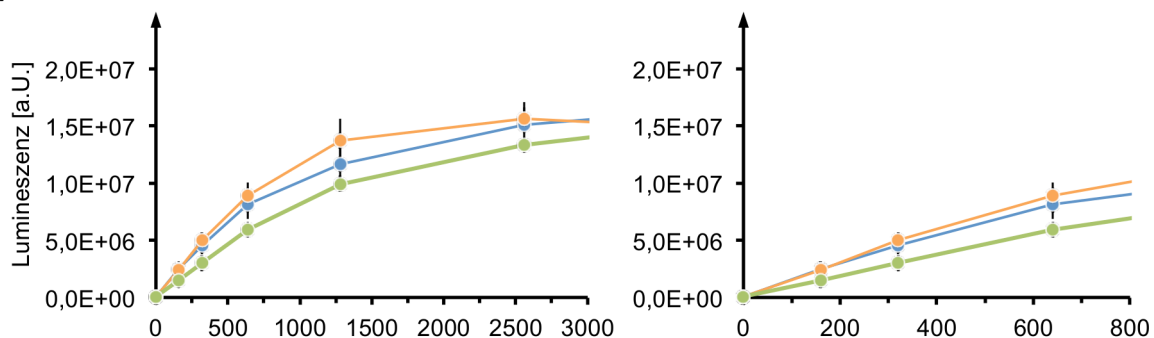


**Abbildung A1 (fortgesetzt).** Ermittlung der zu verwendenden Zellzahl pro Well. Titration der Zellzahl und Auftragung gegen das erhaltene lumineszente Signal für die Zelllinien **e)** PC9(T790M), **f)** PC9(T790M/C797S), **g)** H358, **h)** A549.

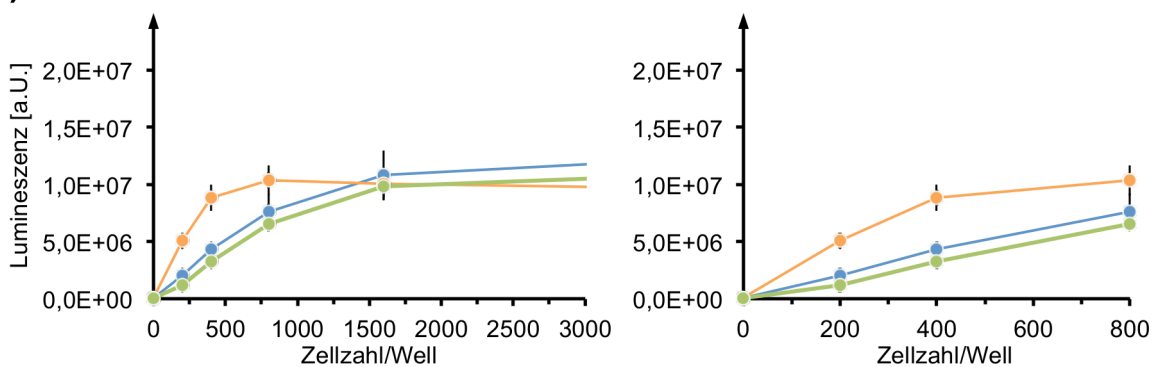
i)



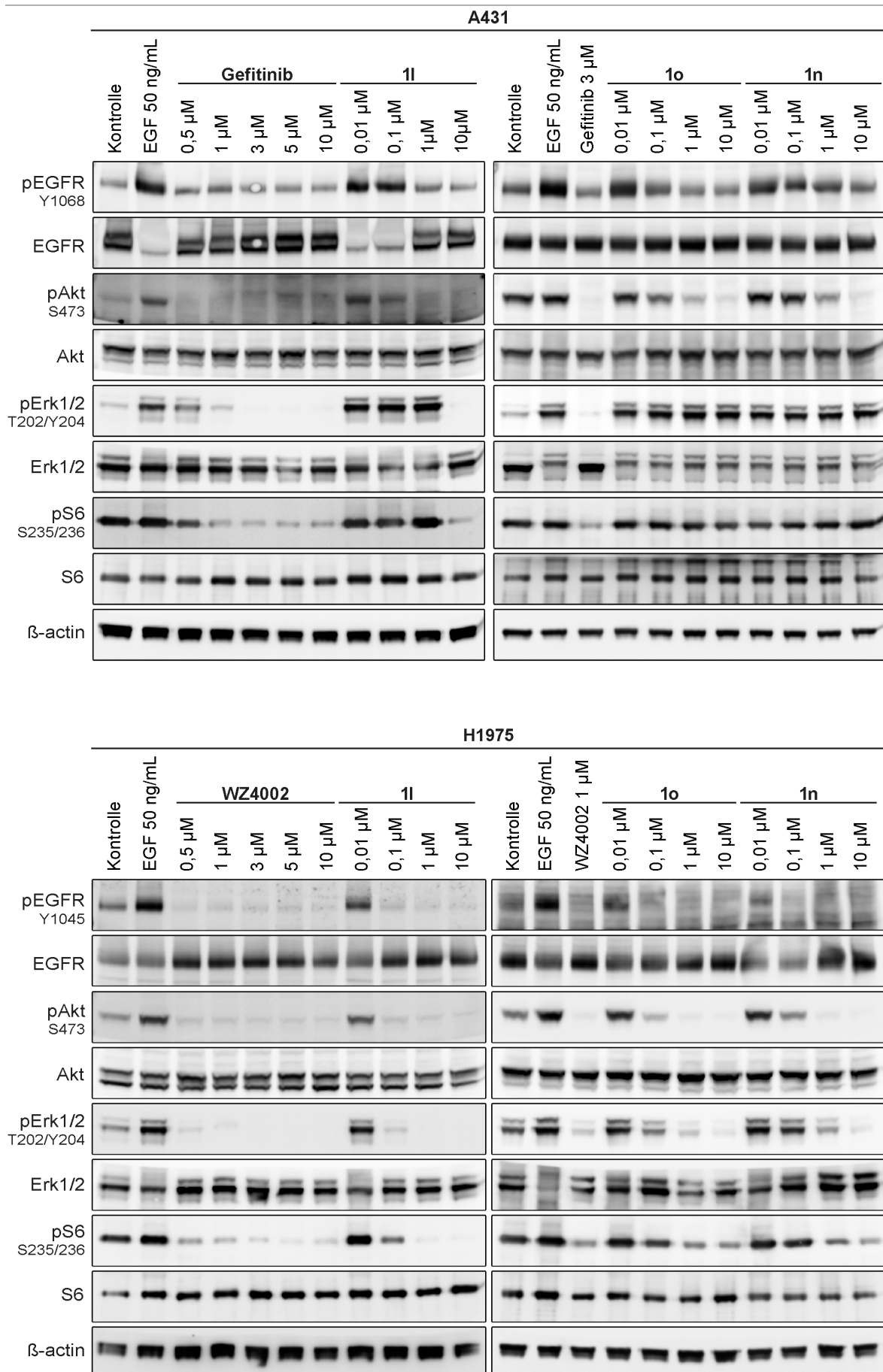
j)

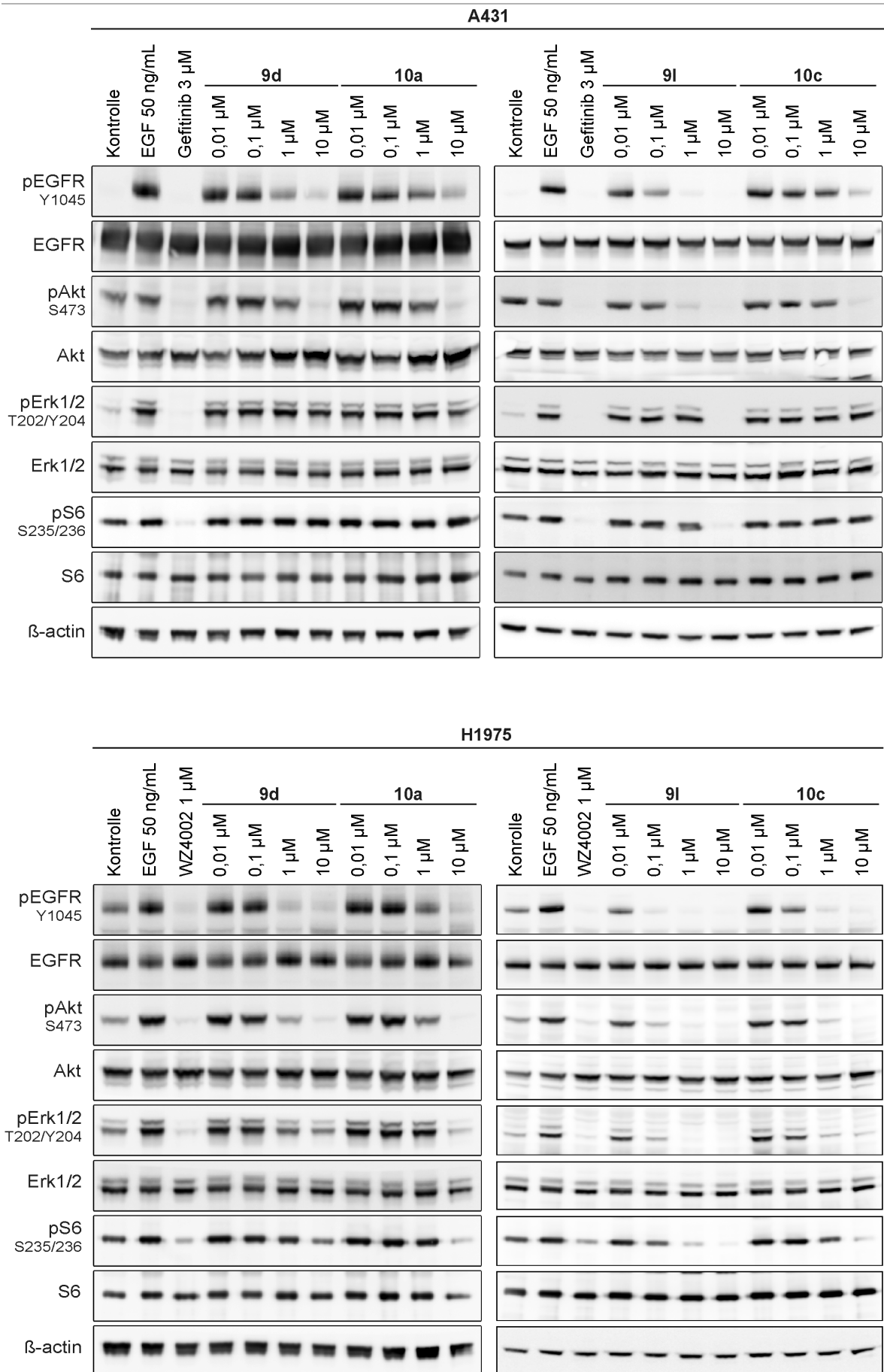


k)

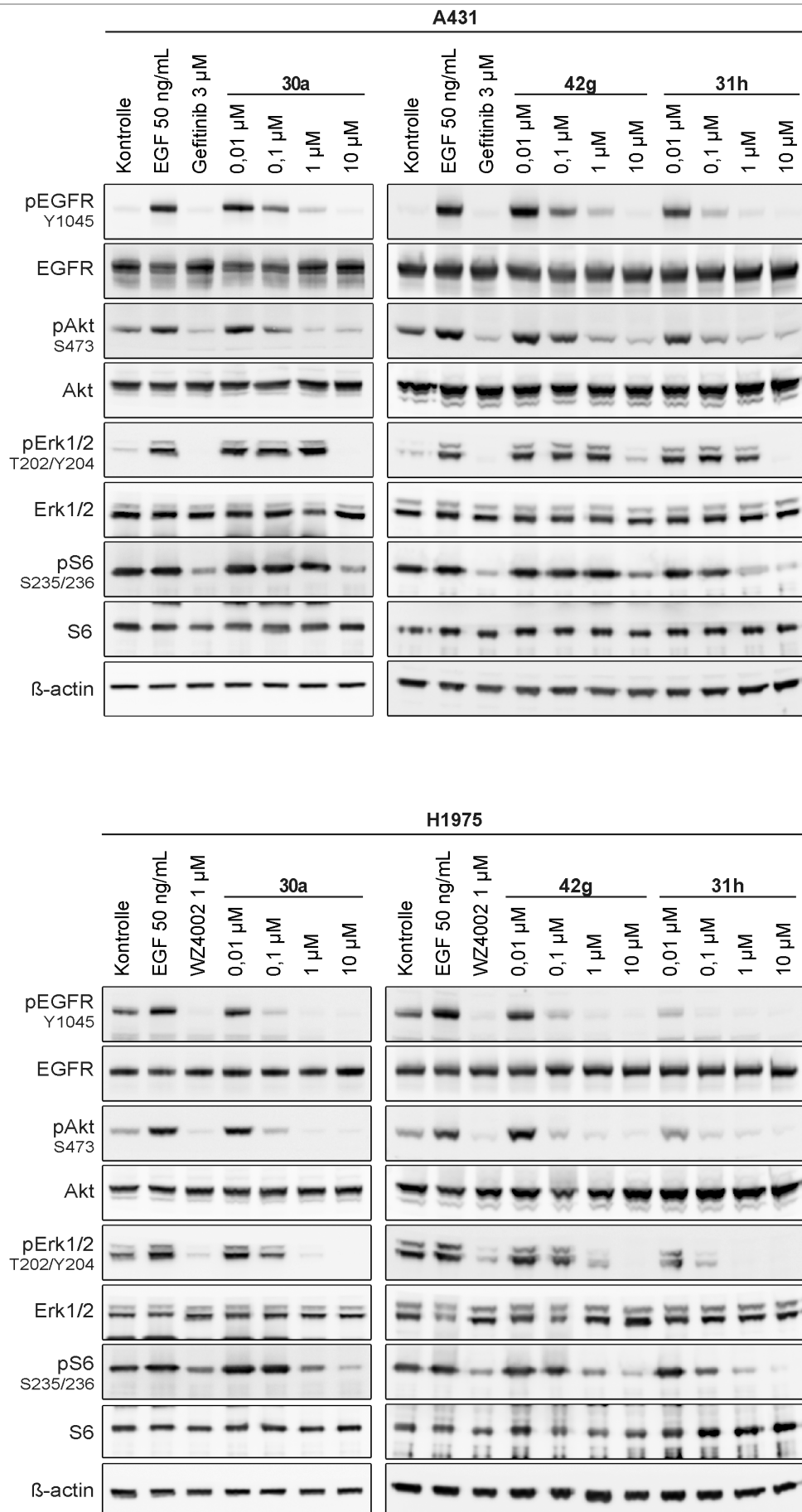


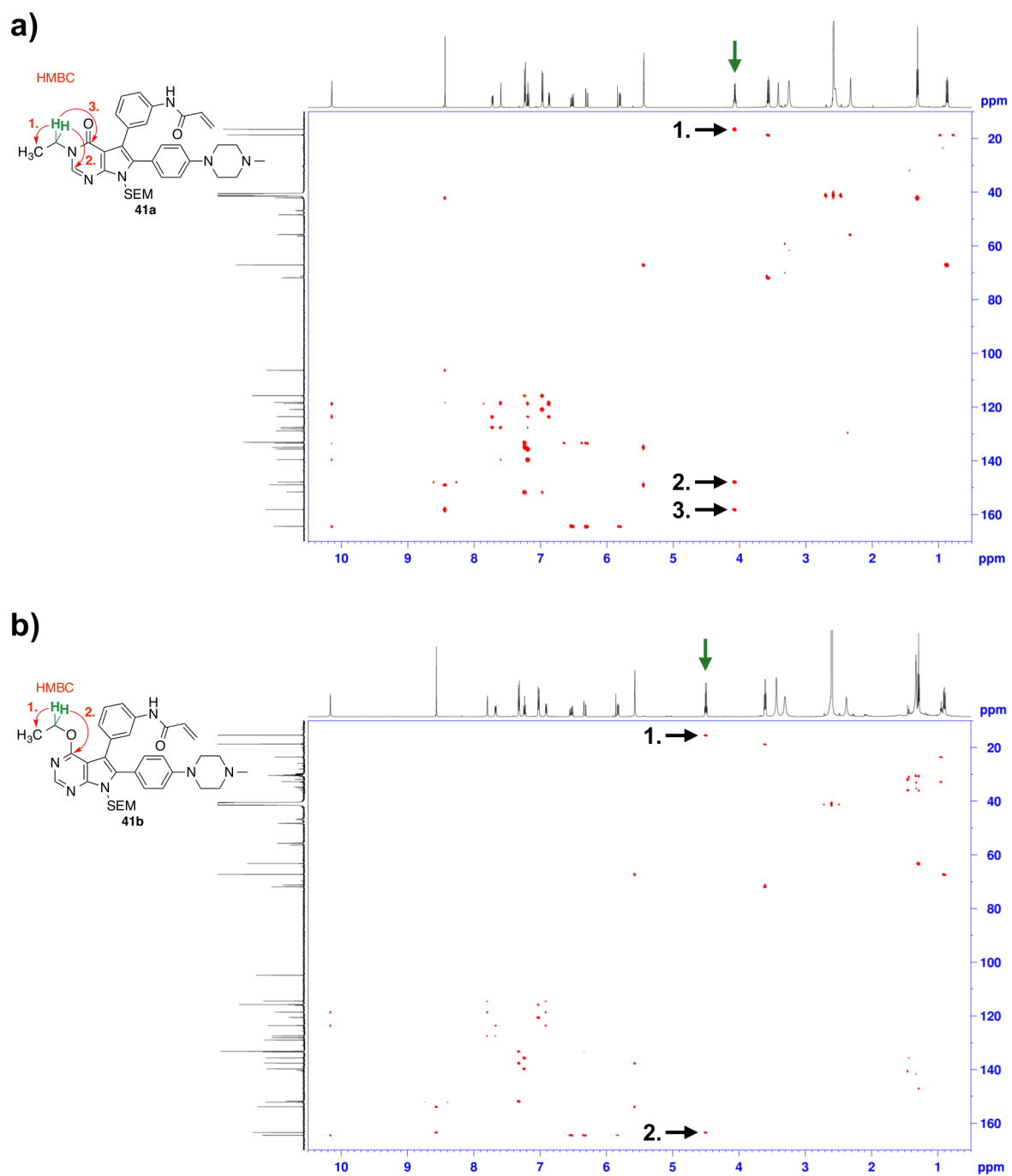
**Abbildung A1 (fortgesetzt).** Ermittlung der zu verwendenden Zellzahl pro Well. Titration der Zellzahl und Auftragung gegen das erhaltene lumineszente Signal für die Zelllinien i) SCCNC4, j) H1781, k) Ba/F3(insYVMA).





**Abbildung A3.** Western Blot-Analysen von Aminoindazol-basierten Inhibitoren.

**Abbildung A4.** Western Blot-Analysen von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.



**Abbildung A5.** HMBC NMR-Analyse bestätigt die Struktur der Konstitutionsisomere **41a** und **41b**.

**Tabelle A1.** Ermittlung der zu verwendenden Zellzahl pro Well für die Zelllinie SCCNC4 durch Testung von Referenzverbindungen bei verschiedenen Zellzahlen.

Cpd	SCCNC4 CTG EC <sub>50</sub> [nM]		
	100 Zellen/Well	200 Zellen/Well	300 Zellen/Well
<b>Erlotinib</b>	2000 ± 1200	7200 ± 2500	8200 ± 1400
<b>Gefitinib</b>	1900 ± 1800	7200 ± 420	7300 ± 920
<b>Afatinib</b>	247 ± 236	820 ± 505	1100 ± 180
<b>Canertinib</b>	717 ± 664	4600 ± 2300	6000 ± 1300
<b>Neratinib</b>	167 ± 39	422 ± 207	435 ± 117
<b>Lapatinib</b>	4700 ± 1900	15000 ± 8600	1500 ± 1300
<b>Osimertinib</b>	422 ± 322	1300 ± 950	805 ± 280

**Tabelle A2.** Pharmakokinetische Parameter von repräsentativen Aminoindazol-basierten Inhibitoren.

Cpd	Mikrosomaler Abbau CL <sub>int</sub> [μL min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]		Plasmastabilität [% verbleibend]	
	Human	Maus	Human	Maus
<b>9d</b>	1,2	28,2	75,8	95,9
<b>9f</b>	3,6	<1	85,7	91,7
<b>9l</b>	3,4	21,6	77,8	97,9
<b>10a</b>	<1	<1	91,7	95,9
<b>10c</b>	<1	3,9	82,3	90,0
<b>Gefitinib</b>	39,5	157,5	90,3	91,5
<b>Osimertinib</b>	5,1	51,2	>99	>99
<b>Rociletinib</b>	4,1	81,1	77,8	75,2



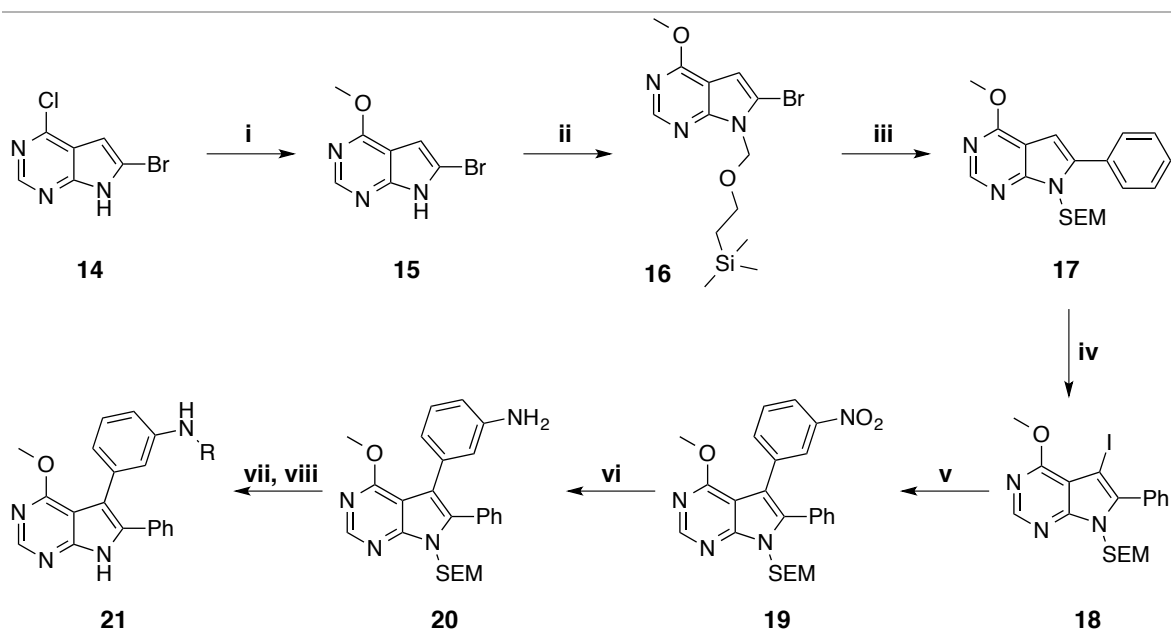
**Tabelle A3.** Pharmakokinetische Parameter von repräsentativen Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

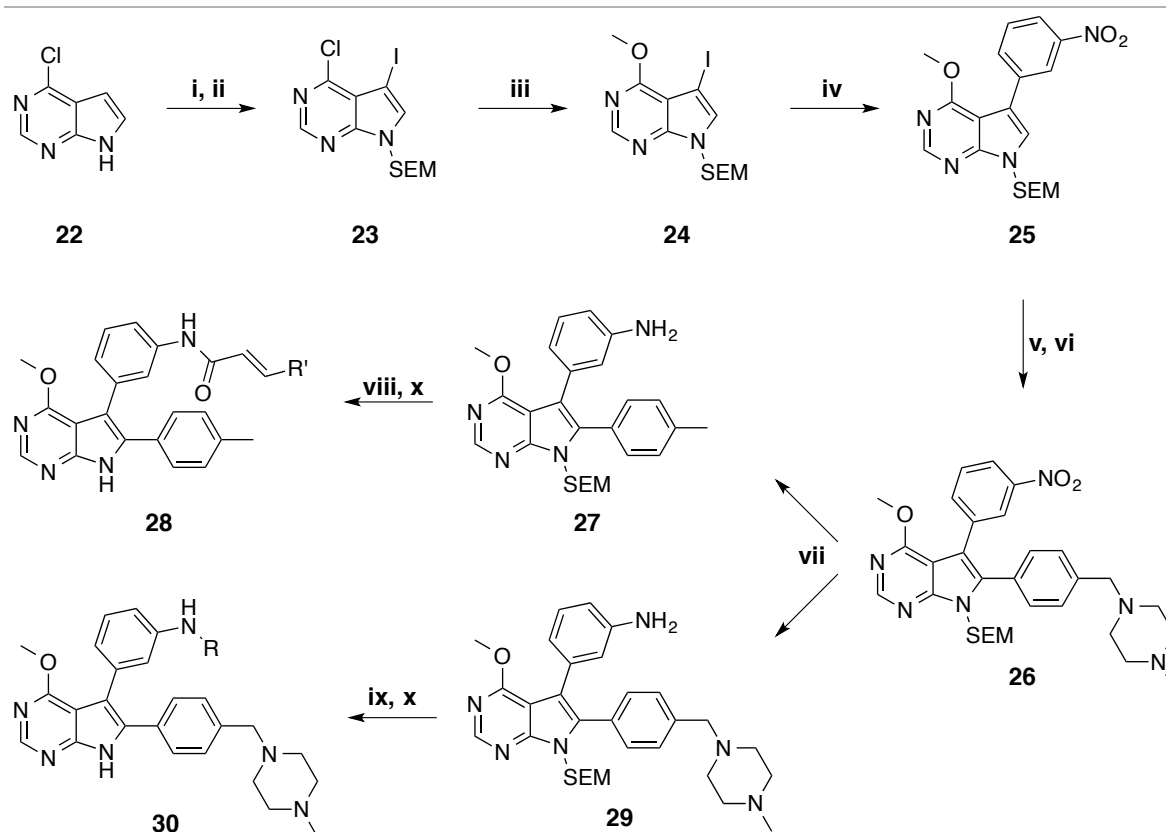
<b>Cpd</b>	<b>MLM CL<sub>int</sub></b> [ $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	<b>cLogP<sup>a</sup></b>	<b>LLE<sup>b</sup></b> (H1975 / EGFR-L858R/T790M)
<b>21a</b>	156	4,0	0,9 / 2,8
<b>28a</b>	118	4,5	1,2 / 2,3
<b>28b</b>	26	4,6	1,4 / 3,0
<b>30a</b>	26	4,2	2,7 / 4,2
<b>33b</b>	8	3,7	2,7 / 6,3
<b>42b</b>	4	2,9	3,9 / 6,4
<b>42g</b>	8	3,2	4,0 / 5,8
<b>42i</b>	84	3,9	2,7 / 5,0
<b>42j</b>	30	4,5	2,6 / 4,9
<b>31d</b>	50	5,5	1,7 / >4,5
<b>31f</b>	128	5,5	1,5 / >4,5
<b>31g</b>	46	4,7	2,7 / 5,3
<b>31h</b>	46	5,4	1,9 / >4,6
<b>Afatinib</b>	6	4,3	1,9 / 5,2
<b>WZ4002</b>	66	4,1	2,9 / 5,6
<b>Osimertinib</b>	60	4,6	3,2 / 4,9

<sup>a</sup>cLogP-Werte wurden mit Chem3D (Perkin Elmer) berechnet. <sup>b</sup>Liganden Lipophilizitäts-Effizienz (LLE) wurde berechnet aus H1975 pEC<sub>50</sub> bzw. EGFR-L858R/T790M pIC<sub>50</sub> – cLogP. MLM = Maus Leber-Mikrosomen.

**Tabelle A4.** *In vivo* pharmakokinetische Parameter der Verbindung **31h** in Mäusen nach intraperitonealer (IP), intravenöser (IV) und peroraler (PO) Verabreichung.

	IV (2 mg kg <sup>-1</sup> )		IP (20 mg kg <sup>-1</sup> )	PO (20 mg kg <sup>-1</sup> )
<b>t<sub>1/2</sub></b> [h]	0,89	<b>t<sub>1/2</sub></b> [h]	1,21	n.b. <sup>a</sup>
<b>C<sub>0</sub></b> [ng mL <sup>-1</sup> ]	258	<b>C<sub>max</sub></b> [ng mL <sup>-1</sup> ]	1770	56
<b>AUC</b> [h ng mL <sup>-1</sup> ]	131	<b>AUC</b> [h ng mL <sup>-1</sup> ]	3917	n.b. <sup>a</sup>
<b>CL</b> [L h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> ]	15	<b>F</b> [%]	258	9
<b>V<sub>ss</sub></b> [L kg <sup>-1</sup> ]	16			

<sup>a</sup>konnte nicht berechnet werden.**Schema A1.** Synthese des ersten Sets von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren. Reaktionsbedingungen: (i) NaOMe:MeOH (1:1.5), 70 °C, 87%; (ii) SEM-Cl, NaH, DMF, 0 °C, 67%; (iii) Phenylboronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF:H<sub>2</sub>O (5:1), 80 °C, 84%; (iv) *N*-Iodsuccinimid, MeCN, RT, 97%; (v) *meta*-Nitrophenylboronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF:H<sub>2</sub>O (5:1), 80 °C, 89%; (vi) Pd/C, NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, EtOH, Reflux, quant.; (vii) Acryloylchlorid oder Propionylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C; (viii) TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3), RT, 45-54% über zwei.



**Schema A2.** Synthese des zweiten Sets von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren. Reaktionsbedingungen: **(i)** *N*-Iodsuccinimid, DMF, RT, 97%; **(ii)** SEM-Cl, NaH, THF, 0 °C, 79%; **(iii)** NaOMe:MeOH (1:1.5), 70 °C, 99%; **(iv)** *meta*-Nitrophenylboronsäure, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN:H<sub>2</sub>O (2:1), 70 °C, 55%; **(v)** *N*-Bromsuccinimid, MeCN, RT, 85%; **(vi)** 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)phenylboronsäure Pinacolester, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Dioxan:H<sub>2</sub>O (5:1), 80 °C, 50%; **(vii)** Pd/C, NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, EtOH, Reflux, 74%; **(viii)** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C bzw. 4-(Dimethylamino)crotonsäure oder 4-(Piperidin-1-yl)but-2-enoessäure Hydrochlorid, Oxalylchlorid, DMF (kat.), THF:NMP (2:1), 0 °C; **(ix)** Acryloylchlorid oder Propionylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C; **(x)** TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3), RT, 19-99% über zwei Schritte.



## **7. EXPERIMENTELLER TEIL**

### **7.1. Zellkultur**

Die Zelllinien A431, HCC827, H1975, H358, A549 und H1781 wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) erhalten. Die Zelllinien PC9, PC9(T790M), PC9(T790M/C797S) und Ba/F3(Her2-A775\_G776insYVMA) wurden von der Abteilung für Translationale Genomik der Universität Köln (Arbeitsgruppe: M. Sos bzw. R. Thomas) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie SCCNC4 wurde vom Institut für Pathologie des Uniklinikums Köln (Arbeitsgruppe: R. Büttner) erhalten.

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C temperiert.

Die Zelllinien wurden zuletzt im August 2017 durch STR Profilierung von 16 Allelen authentifiziert.

#### **7.1.1. Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -150 °C. Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde das Kryovial (1 mL Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und anschließend in ein 15 mL Falcon mit 11 mL Kultivierungsmedium überführt. Die Zellsuspension wurde zur Kultivierung in einer T-75-Kulturfasche ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

#### **7.1.2. Zellkultivierung**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei hoher Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Für A431 Zellen wurde DMEM high glucose Medium (Life Technologies) verwendet und für HCC827, H1975, H358, A549, H1781, sowie Ba/F3(insYVMA) Zellen wurde RPMI 1640 Medium (Life Technologies) verwendet. Beide Medien enthielten L-Glutamin und wurden mit 10% FBS (GE Healthcare) und 1% PenStrep (Life Technologies) versetzt. Für SCCNC4 Zellen wurde DMEM high glucose Medium (Life Technologies) verwendet, welches L-Glutamin enthielt und mit 20% FBS (GE Healthcare) und 1% PenStrep (Life Technologies) versetzt wurde. Das Medium wurde alle 48 h gewechselt.

#### **7.1.3. Passagieren von Zellen**

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Dann wurden die adhärennten Zellen mit einer 0,25%-igen Trypsin/EDTA-Lösung gelöst

(2,5 mL/T-75-Kulturflasche, 5 min, 37 °C). Die Zellsuspension wurde in 10,5 mL Kulturmedium aufgenommen und bei 1000 rpm sedimentiert (25 °C, 5 min). Das Pellet wurde in 10 mL frischem Medium aufgenommen. Zur Weiterkultivierung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro T-75 Flasche in 12 mL Medium ausgesät.

#### **7.1.4. Einfrieren von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in Einfriermedium (versetzt mit 10% DMSO) resuspendiert. Die Konzentration wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und je 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryovial überführt. Die Kryovials wurden 24 h in einem Freezing Container bei -80 °C gelagert, um ein schrittweises Abkühlen der Zellen zu gewährleisten. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte anschließend bei -150 °C.

### **7.2. Zellulärer CellTiter-Glo Viabilitäts-Assay**

#### **7.2.1. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte automatisch mit dem Countess II Zellzähler. Dazu wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung gemischt und 10 µL dieser Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und ausgezählt.

#### **7.2.2. Zellzahloptimierung**

Zur Bestimmung des linearen Wachstumsbereichs jeder Zelllinie wurden Zellen auf einer 384-Well Platte in Verdünnungsreihen mit jeweils acht Zellzahlen/Well ausgesät und 120 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellviabilitätsmessung mittel des CTG-Reagenzes, wie nachfolgend beschrieben.

#### **7.2.3. Zellviabilitätsassay zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes**

Zur Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes wurden zunächst Zellen mit der entsprechenden Zellzahl (150-300 Zellen/Well, 25 µL) mittels Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser (ThermoFisher Scientific) kontaktlos auf einer 384-Well Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die chemischen Verbindungen in serieller Verdünnungsreihe (30 µM bis 14 nM) in Duplikaten, sowie DMSO und Staurosporin als Kontrollen mit dem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte) auf die Zellsuspension transferiert. Es folgte eine Inkubation für 96 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen, das Medium sowie das CTG Reagenz (Promega) auf Raumtemperatur temperiert. Das CTG Reagenz

wurde 1:1 mit dem jeweiligen Kultivierungsmedium gemischt und 25  $\mu\text{L}$ /Well mittels Multidrop auf die 384-Well Platte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 2 min bei 600 rpm geschüttelt, um die Zelllyse zu induzieren und anschließend für 20 min im Dunkeln inkubiert, um das lumineszierende Signal zu stabilisieren. Anschließend erfolgte das Auslesen der Lumineszenz am EnVision microplate reader (Perkin Elmer) unter Verwendung von 500 ms Integrationszeit. Die Analyse der Daten und die Auswertung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte erfolgte mit dem Quattro Research Software Paket. Als Qualitätskontrolle wurde der Z'-Faktor aus jeweils 16 DMSO- und Staurosporin-Werten berechnet und nur Assay-Ergebnisse mit einem Z'-Faktor von  $\geq 0,5$  wurden weiter verwendet. Alle Messungen wurden wenigstens in zwei unabhängigen Experimenten wiederholt, sofern nicht anders angegeben.

### 7.3. Western Blotting

Die Zellen wurden an Tag 1 bei Zellzahlen von  $4 \times 10^5$  (H1975) und  $5 \times 10^5$  (A431) Zellen/Well in 6-Well Platten ausgesät und bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. An Tag 2 wurde das Medium gewechselt und die Zellen über Nacht gehungert (Medium mit 0,5% FBS-Gehalt), um an Tag 3 für 1 h mit den jeweiligen chemischen Verbindungen behandelt zu werden, gefolgt von 30 min EGF-Stimulation (50 ng/mL). Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen, unter Verwendung von 100  $\mu\text{L}$ /Well Lysepuffer abgekratzt und auf einem Rotator (Stuart Scientific) für 1 h bei 4 °C lysiert. Der Lysepuffer enthielt 1% (v/v) NP-40, 50 mM (v/v) Tris-HCl pH 8,0, 100 mM (m/v) Natriumfluorid, 30 mM (m/v) Natriumpyrophosphat, 2 mM (m/v) Natriummolybdat, 5 mM (v/v) EDTA und 2 mM (m/v) Natriumvanadat. Kurz vor der Verwendung wurde 1% 10 mg/mL Aprotinin und Leupeptin, sowie 10% 100 mM PMSF und 200 mM Natriumvanadat frisch hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und die Proteinkonzentration mittels Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) bestimmt. SDS-Ladepuffer mit 0.5 M (v/v) Tris-HCl pH 6,7, 10% (v/v) SDS, (w/v) DTT, (v/v) Glycerol und 0.05% (w/v) Bromophenolblau wurde zugegeben und die Lysate für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membranen (GE Healthcare/Amersham-Biosciences) gebロットet, unter Verwendung des X Cell II Blot module entsprechend der Gebrauchsanweisung (Thermo Fisher Scientific). Die Membranen wurden geblockt mit 1x Net-G Puffer (10x Puffer enthält 1.5 M (w/v) NaCl, 50 mM (w/v) EDTA, 500 mM (w/v) Tris 0.5% (v/v) Tween 20 und 0.4% (w/v) Gelatine) und anschließend bei 4 °C über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert (1:5.000 für  $\beta$ -Actin, 1:1000 für alle weiteren Antikörper). Nach einem Wasch-Schritt wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 2 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert (anti-IgG-HRP 1:2000, CST) und erneut gewaschen.

Veränderungen der Protein-Expressionslevel und Phosphorylierung wurde visualisiert mittels Chemilumineszenz mittels Amersham ECL Prime (GE Healthcare/Amersham-Biosciences) und aufgenommen und quantifiziert mittels FUJI LAS3000 System mit der Science Lab 2001 ImageGauge 4.0 Software (Fujifilm Medial Systems).

### **Antikörper**

Kaninchen Antikörper, spezifisch für phospho-EGFR (Tyr1045 bzw. Tyr1068), EGFR, Akt, phospho-Akt (Ser473), p42/44 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6 ribosomales Protein, phospho-S6 ribosomales Protein (Ser235/236), Maus anti- $\beta$ -Actin Antikörper, sowie HRP-konjugierte anti-Kaninchen und anti-Maus sekundäre Antikörper wurden von Cell Signaling bezogen.

## **7.4. Aktivitäts-basierter Assay zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung und Charakterisierung der Bindungskinetik**

IC<sub>50</sub>-Bestimmung für EGFR und mutierte Varianten (Carna Biosciences, lot13CBS-0005K für EGFR-WT; Carna, lot13CBS-0537B für EGFR-L858R und Carna, lot12CBS-0765B für EGFR-L858R/T790M) wurde mittels HTRF KinEASE-TK Assay von Cisbio entsprechend der Gebrauchsanweisung durchgeführt. Die Menge an EGFR in jedem Well wurde auf 0,60 ng EGFR-WT (0,67 nM), 0,10 ng EGFR-L858R (0,11 nM), 0,07 ng EGFR-T790M/L858R (0,08 nM) bzw. 0,80 ng EGFR-L858R/T790M/C797S (0,88 nM) eingestellt. Kinase und Inhibitor wurden für 30 min vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von ATP und einem artifizielles Substrat-Peptid (TK-Substrat von Cisbio) gestartet wurde, welches durch die EGFR-Kinase phosphoryliert wird. Die jeweilige ATP-Konzentration wurde auf den zugehörigen  $K_m$ -Wert eingestellt (9,5  $\mu$ M für EGFR-WT, 9  $\mu$ M für EGFR-L858R, 4  $\mu$ M für EGFR-L858R/T790M und 11  $\mu$ M für EGFR-L858R/T790M/C797S), während Substrat-Konzentrationen von 1  $\mu$ M, 225 nM, 200 nM bzw. 325 nM verwendet wurden. Nach Ablauf der Reaktionszeit (25 min für WT, 15 min für L858R, 20 min für T790M/L858R und 10 min für L858R/T790M/C797S), wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA-haltigem Puffer gestoppt, welcher ebenfalls einen Europium Kryptat-markierten anti-Phosphotyrosin Antikörper und Fluorophor XL665-markiertes Streptavidin enthielt. FRET zwischen dem Europium Kryptat und XL665 wurde nach Inkubation für eine weitere Stunde gemessen, um die Phosphorylierung des Substrat-Peptids zu quantifizieren. Dazu wurde die Fluoreszenz bei 620 nm (Eu<sup>3+</sup>-markierter Antikörper) und 665 nm (XL665-markiertes Streptavidin) 50  $\mu$ s nach der Anregung bei 320 nm mittels EnVision multimode plate reader (Perkin Elmer) detektiert. Der Quotient dieser beiden Intensitäten, ermittelt für eine serielle Verdünnungsreihe



mit acht Konzentrationen, wurde dann mittels Quattro Software Suite für IC<sub>50</sub>-Bestimmung analysiert. Jede Reaktion wurde in Duplikaten durchgeführt und mindestens drei Unabhängige IC<sub>50</sub>-Bestimmungen wurden durchgeführt.

Für die Charakterisierung der Bindungskinetik ( $k_{\text{inact}}/K_i$ ) wurden die jeweiligen Inhibitoren mit EGFR-WT, -L858R bzw. -L858R/T790M über Zeiträume zwischen 2–90 min inkubiert, während die Dauer der enzymatischen und stop-Reaktion beibehalten wurden, wie zuvor beschrieben. Eine serielle Verdünnungsreihe mit acht Konzentrationen, beginnend bei 20  $\mu\text{M}$  finaler Inhibitor-Konzentration, wurde zugegeben. Diese wurde generiert mittels dem akustischen Dispenser ECHO 520 Liquid Handler von Labcyte und der zugehörigen Dose-response Software Echo Dose-Response v1.5.4. Die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen und die Parameter  $k_{\text{inact}}$  und  $K_i$  analog zur literaturbeschriebenen Methode abgeleitet (B.F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga, *J. Biomol. Screen* **2009**, 14, 913-923).

## 7.5. Kristallisierung, Strukturbestimmung und Refinement von cSrc-T338M/S345C

Die Inhibitoren **32**, **33a** und **42b** wurden mit cSrc-T338M/S345C co-kristallisiert, durch Inkubation von 5 mg/mL Protein mit einem dreifachen molaren Überschuss an Inhibitor (10 mM DMSO-Stammlösung) für 1 h bei 4 °C, um die Ausbildung des Enzym–Inhibitor-Komplexes vor der Kristallisation zu ermöglichen. Das Kristallwachstum wurde mittels Methode des hängenden Tropfen bei 20 °C durchgeführt, nachdem 1  $\mu\text{L}$  Protein/Inhibitor-Lösung mit 1  $\mu\text{L}$  Reservoir-Lösung (90 mM MES, pH 6,5, 10% PEG 20000, 15% Glycerol) gemischt wurden. Datensätze wurde aufgenommen an der PX10SA beamline der Swiss Light Source (PSI, Villingen, Switzerland). Alle Datensätze wurden prozessiert mit XDS und skaliert mit XSCALE (W. Kabsch, *Journal of Applied Crystallography* **1993**, 26, 795-800).

Die Kristallstrukturen von cSrc-T338M/S345C im Komplex mit den Verbindungen **32**, **33a** und **42b** wurden gelöst durch molekularen Ersatz mit PHASER (R.J. Read, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, 57, 1373-1382) unter Verwendung der Struktur PDB ID: 3G5D (M. Getlik, C. Grütter, J. R. Simard, S. Klüter, M. Rabiller, H.B. Rode, A. Robubi, D. Rauh *J Med Chem* **2009**, 52, 3915-3926) als Templat. Das cSrc-Molekül in der asymmetrischen Einheit wurde mit der Software COOT manuell angepasst (P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, 60, 2126-2132). Das Refinement wurde mit REFMAC5 durchgeführt (G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, 53, 240-255). Topologie-Dateien der Inhibitoren wurden mit dem Dundee PRODRG2 server (R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.

Thornton *J Appl Crystallogr* **1993**, 26, 283-291) generiert. Verfeinerte Strukturen wurden validiert mit PROCHECK (R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J Appl Crystallogr* **1993**, 26, 283-291) und dem PDB Validierungs-Server. Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt (W.L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*).

## 7.6. Massenspektrometrische Untersuchungen

Für die MS-Experimente wurde EGFR-T790 verwendet. Dazu wurden 26,4  $\mu\text{M}$  des Proteins mit 79,2  $\mu\text{M}$  der entsprechenden Verbindung in Puffer (250 mM NaCl, 25 mM TRIS, 10% Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8,0) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aliquots mit einem ESI-Massenspektrometer Velos Pro (2d Ionenfalle) der Firma Thermo Fisher Scientific vermessen. Insgesamt wurden 5  $\mu\text{L}$  der Probe in eine Vydac 214TP C<sub>4</sub> (5  $\mu\text{M}$ , 150 $\times$ 2,1 mm) Säule injiziert und mit einem Lösungsmittelgradienten beginnend mit 20% Lösungsmittel B (Acetonitril + 0,1% TFA) für 5 min (Steigerung auf 90% Lösungsmittel B über 14 min mit einer Flussrate von 210  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) und Lösemittel A (Wasser + 0,1% TFA) eluiert. Ein Messbereich ( $m/z$ ) zwischen 700 und 2000 wurde untersucht und die erhaltenen Rohdaten mit der Software MagTran (Version 1.02) dekonvolutiert und ausgewertet (Z.Q. Zhang, A.G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* **1998**, 9, 225-233).

Für nano-LC-MS/MS Messungen wurde ein Aliquot der Proben bei Raumtemperatur für 30 min im Dunklen mit 10 mM Iodacetamid inkubiert, um alle freien Cystein-Seitenketten zu Carbamidomethylieren. Anschließend wurde 1  $\mu\text{g}$  mit der Protease Subtilisin (Sigma Aldrich) in einem Verhältnis von 1:10 (Protease:Protein) für 20 min bei 56 °C verdaut. Der Verdau wurde gestoppt durch die Zugabe von 1% TFA und 2 pmol wurden mittels nano-LC-MS/MS analysiert, unter Verwendung eines Orbitrap Fusion Lumos Massen-Spektrometer, onlinegekoppelt an ein Ultimate 3000 nano RSLC System (beides von Thermo Scientific).

Die Peptide wurden vorkonzentriert auf einer 75  $\mu\text{m} \times 2$  cm C18 trapping Säule für 5 min mit 0,1% TFA (v/v) bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , gefolgt von einer Auftrennung auf einer 75  $\mu\text{m} \times 50$  cm C18 Hauptsäule (beide Pepmap, Thermo Scientific) mit einem 90 min LC Gradienten von 5-70% Lösungsmittel B (84% Acetonitril in 0,1% Ameisensäure) bei einer Flussrate von 250 nL/min. MS-Scans wurden aufgenommen von 300 bis 1500  $m/z$  bei einer Auflösung von 120.000, unter Verwendung des Polysiloxan-Ions bei 445,12002  $m/z$  als Eich-Masse. Im top speed Modus (3 s) wurden die intensivsten Ionen mit Ladungszuständen  $>1$  mit einem 1,2 Da Fenster für die Fragmentierung isoliert, mit Elektronentransfer Dissoziation (ETD), sowie Elektronentransfer/Höhere Energie-

Kollisionsdissoziation (ET<sub>h</sub>cD) unter Verwendung von kalibrierten, Ladungsabhängigen ETD-Parametern und zusätzlicher HCD-Energie von 30. MS/MS-Spektren wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 aufgenommen, AGC Zielwerte wurden für die MS auf 200.000 und für die MS/MS auf 100.000 gesetzt. Die maximalen Injektionszeiten betrugen 50 bzw. 200 ms.

Die Rohdaten wurden analysiert mit PEAKS 7.5 (*de novo* und DB node) (J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, Ma, B. *Molecular & cellular proteomics : MCP 11* **2012**, M111.010587) mit automatischer Korrektur der Vorläufer-Massen. Die Aminosäure-Sequenz von EGFR-T790M wurde mit einer *P. furiosus* Datenbank verglichen (2.045 Zielsequenzen, heruntergeladen von UniProt im Januar 2016) (M. Vaudel, J.M. Burkhardt, D.Breiter, R.P. Zahedi, A. Sickmann, L. Martens, *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 10, 5065-5071) und die Suche im target/decoy Modus durchgeführt, um eine Falsch-positiv-Rate zu berechnen (FDR). Die Enzymspezifität wurde auf "none" gesetzt und Cystein-Modifikationen durch entweder Carbamidomethylierung (+57.02146 Da) oder **31h** (+510.27432 Da) wurden als variabel gesetzt, mit einem Maximum von 3 pro Peptid. Der Fragmentierungsmodus wurde auf ETD gesetzt, um c- und z-Ionen beim Scoring zu berücksichtigen. Die Massentoleranz wurde für Vorläufer-Massen auf 10 ppm gesetzt und für Fragment-Ionen auf 0.02 Da. FDR wurde eingestellt auf 1% des Peptidspektrum-Match (PSM) Levels.

## 7.7. Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter

### 7.7.1. Mikrosomen-Stabilitäts Assay (Phase I)

Die metabolische Stabilität unter oxidativen Bedingungen wurde in Leber-Mikrosomen verschiedener Spezies untersucht, wobei die Abnahme der intakten chemischen Verbindung bei einer Konzentration von 3 µM bei 37 °C über einen Zeitraum von 50 min (HLM) bzw. 60 min (MLM) LC/MS-basiert bestimmt wurde. Basierend auf der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Verbindung wurde die intrinsische Clearance  $CL_{int}$  *in vitro* berechnet.

### 7.7.2. Plasma-Stabilitäts Assay

Die Plasma-Stabilität wurde untersucht, wobei der Prozentsatz der verbleibenden intakten chemischen Verbindung nach Inkubation in Blutplasma von verschiedenen Spezies bei einer Konzentration von 5 µM über 1 h bei 37 °C LC/MS-basiert bestimmt wurde.

### 7.7.3. Plasma-Protein-Bindung

Die Bindung an Plasma-Proteine wurde untersucht durch Equilibrium-Dialyse mittels Inkubation von Plasma mit der jeweiligen chemischen Verbindung bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M für 6 h bei 37 °C gefolgt von LC/MS-basierter Bestimmung der verbleibenden Konzentration an Inhibitor.

### 7.7.4. PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay)

Die chemische Verbindung wurde von einer 10 mM DMSO-Stammlösung auf eine finale Konzentration von 500  $\mu$ M in 50 mM Hepes Puffer pH 7,4 verdünnt und auf eine mit einer Membran-bildenden Lösung aus 10% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Sigma Aldrich) und 0,5% (w/v) Cholesterol (Sigma Aldrich) in Dodecan bedeckten Transwell-Membran transferiert. Nach 16 h Inkubation bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, wurde die optische Dichte im Receiver-Well zwischen 250 und 500 nm in Intervallen von 10 nm gemessen. Der Prozent Flux wurde berechnet aus der AUC zwischen 250 und 500 nm und normalisiert auf die Absorption der Verbindung im Anschluss an 16 h Inkubation aus einem Transwell, welches eine mit 50% MeOH in 50 mM Hepes Puffer pH 7,4 bedeckte Membran enthielt (M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J Med Chem* **1998**, 41, 1007-1010).

### 7.7.5. Caco-2 Assay

Für den Caco-2 Zellassay wurde eine 10 mM DMSO-Stammlösung der Verbindung auf eine finale Konzentration von 5  $\mu$ M in HBSS Puffer pH 7,4 verdünnt und für 2 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> auf einem Monolayer aus Caco-2 Zellen (ATCC) inkubiert, welche für 21 Tage auf einer Transwell-Membran (Millipore) angewachsen wurden. Die Konzentration der Verbindung wurde im Receiver- und Donor-Well gemessen. Die apparente Permeabilität ( $P_{app}$ ) von der apikalen zur basolateralen Richtung und umgekehrt wurde berechnet aus der Gleichung:  $P_{app} = 1/Ac_0 (dQ/dt)$ , wobei A für die Oberfläche der Membran steht,  $c_0$  ist die Donor Konzentration der Verbindung bei  $t = 0$  und  $dQ/dt$  die Menge an transportierter Verbindung innerhalb der vorgegebenen Zeitspanne von 2 Stunden.

### 7.7.6. *in vivo*-Pharmakokinetik

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik der Verbindung **31h** wurden insgesamt 36 männliche RjOrl:SWISS (CD1) Mäuse im Alter von 8–10 Wochen mit einem Körpergewicht (Kwt) zwischen 29 und 31 g verwendet (Janvier). Die Mäuse wurden *ad libitum* gefüttert mit "Allein-Futter für Ratten-/Mäusehaltung" von ssniff

special diets GmbH. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und wurden bei einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Experimente wurden durch die örtlichen Behörden genehmigt. Die Pharmakokinetik wurde untersucht für orale (PO), intraperitoneale (IP) und intravenöse (IV) Verabreichung. Für orale und intraperitoneale Verabreichung wurde eine Stammlösung aus 2 mg/mL **31h** in 10% DMSO und 90% wässrige Lösung 30%iger 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin angesetzt. Um Dosen von 20 mg/kg Kwt zu erreichen wurden 300  $\mu$ L pro 30 g Maus Kwt appliziert. Für die intravenöse Verabreichung wurde 2 mg/mL DMSO-Stammlösung vorbereitet und 30  $\mu$ L pro 30 g Maus Kwt appliziert, um eine Konzentration von 2 mg/kg Kwt zu erreichen. Die Mäuse wurden nach 5, 15, 45 und 135 min nach Verabreichung der Verbindung euthanasiert und ca. 100  $\mu$ L Blut aus der linken Herzkammer entnommen. Drei Mäuse wurden pro Zeitpunkt und Verabreichungsform analysiert. Unmittelbar nach der Blutabnahme wurde die Probe bei 16,200 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Plasma bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Vor der LC-MS/MS Analyse wurden die Plasmaproteine mit Acetonitril präzipitiert, welches einen internen Standard enthielt und anschließend filtriert. Eine Kalibrier-Kurve wurde durch angereicherte Leerproben des Plasmas aufgenommen. **31h** wurde mit einem Shimadzu UPLC-System, gekoppelt an ein QTrap 4000 Hybrid triple quadrupol/lineare Ionenfalle Massenspektrometer (AB Sciex) vermessen. Die Regressionsgleichung der Kalibrier-Kurve wurde verwendet um die Plasmakonzentration zu bestimmen. Die pharmakokinetischen Parameter wurden mit der PKSolver Software<sup>2</sup> berechnet (Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie *Comput Methods Programs Biomed* **2010**, *99*, 306-314).

## 7.8. Organische Synthese

### 7.8.1. Allgemeine Anmerkungen

Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminium DC-Platten Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F254 (Merck) durchgeführt, sichtbar gemacht durch UV-Licht ( $\lambda$  = 254 nm bzw. 366 nm). Mikrowellen-Reaktionen wurden mit dem Monowave 300 Reaktor von Anton Paar durchgeführt. Säulenchromatographie wurde mit Baker Silicagel mit einer Partikelgröße von 40-70  $\mu$ m oder Flash-Säulenchromatographie mit einer Biotage Isolera One unter Verwendung von Biotage SNAP, SNAP Ultra, ZIP Sphere oder ZIP KP-Sil Säulen (25, 10, 5 bzw. 120 g) oder Grace Reverleris C18 40  $\mu$ m Säulen (4 oder 12 g) und mit UV kontrolliert bei  $\lambda$  = 254 und 280 nm. Präparative HPLC erfolgte mit einem Gerät aus der 1200er Serie der Firma Agilent mit VP125/21 Nucleodur C18

Gravity Säule (5  $\mu\text{m}$ , Machery Nagel) und VP20/16 Nucleodur C18 Gravity Vorsäule (Machery Nagel). LC/MS-Messungen wurden mit einem LCQ Advantage MAX (1200er Serie, Agilent) mit Eclipse XDB-C18-Säule (5  $\mu\text{m}$ , 150 $\times$ 1,6 mm, Phenomenex) aufgenommen. Die Auswertung der LC/MS-Spektren erfolgte mit Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., Version 2.0.7),  $^1\text{H}$  NMR und  $^{13}\text{C}$  NMR wurden auf DRX400 (400 MHz), DRX500 (500 MHz) (Bruker) und UnityINOVA-600 (600 MHz) (Varian Associates) oder 400 MHz AVANCE-III HD, 600 MHz AVANCE-III HD (Bruker BioSpin GmbH) mit Cryoprobe und 500 MHz DD2-500 (Agilent Technologies) Spektrometern in  $\text{DMSO}-d_6$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm angegeben und bezieht sich auf den internen Standard des Rest-Lösungsmittels von  $\text{DMSO}-d_6$ , (2,50 bzw. 39,52 ppm),  $\text{CDCl}_3$  (7,26 bzw. 77,16 ppm) oder  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1,94 bzw. 49,00 ppm). Die Kopplungskonstante  $J$  wird in Hz angegeben. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit MestReNova (Mestrelab Research S.L., Version 6.0.3-5604). Hochaufgelöste Massenspektren wurden mittels ESI-FTMS mit einem LTQ Orbitrap (Fouriertransformation Massenspektrometer) gekoppelt an ein Accela HPLC-System (Accela Pumpe, Accela Autosampler und Accela PDA Detektor), beide Systeme von der Firma Thermo Scientific, aufgenommen. Alle finalen Verbindungen wurden auf  $\geq 95\%$  Reinheit aufgereinigt, bestimmt durch NMR-Analyse und LC/MS.

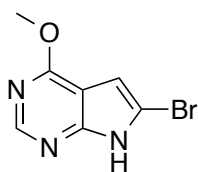
## 7.8.2. Synthesevorschriften

### Allgemeine Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung

Zu einer Lösung aus Verbindung **27a** (bzw. **27b** reversibel) (1.0 eq) in trockenem THF (30 mM) wurde  $\text{PPh}_3$  (5.0 eq) und der entsprechende Alkohol (5.0 eq) zugegeben und die resultierende Lösung für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde DIAD (5.0 eq) hinzugefügt und die Reaktion bis zum vollständigem Umsatz im Ultraschallbad auf 40  $^\circ\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurde Wasser (2 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (95:5) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung mittels  $\text{C}_{18}$ -Säule wurde das Produkt als blassgelber Feststoff erhalten. Die resultierende Verbindung (1.0 eq) wurde umgehend in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur mit TFA (2 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sowie TFA im Luftstrom entfernt und der Überstand in THF (30 mM) aufgenommen, mit wässriger NaOH-Lösung (1 M, 2 mL) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (95:5) extrahiert. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

### Allgemeine Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung

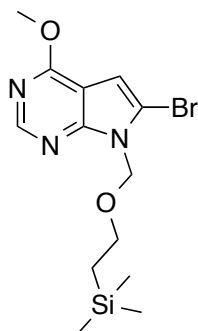
Das substituierte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin wurde in 1-Butanol gelöst und mit HCl versetzt. Der Lösung wurde das Anilin zugegeben und für 72 h bei 80 °C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde durch zweifache Flash-säulenchromatographische Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, dann C<sub>18</sub>-Säule) erhalten. Gegebenenfalls wurde zur Abspaltung der SEM-Schutzgruppe die resultierende Verbindung umgehend in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur mit TFA (2 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion wurde CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sowie TFA im Luftstrom entfernt und der Überstand in THF (30 mM) aufgenommen, mit wässriger NaOH-Lösung (1 M, 2 mL) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurde CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:5) extrahiert. Nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.



### 6-Brom-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (15)

Eine Lösung aus 6-Brom-4-chlor-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**14**) (200.0 mg, 0.9 mmol) und Natriummethanolat (4 mL) in MeOH (6 mL) wurde bei 70 °C bis zur vollständigen Umsetzung (3 d) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser gegeben, NaCl zugefügt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

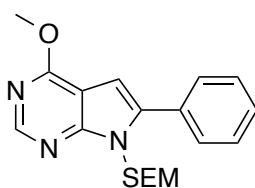
**Ausbeute:** 87% (172.0 mg, 0.8 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.83 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.02 ppm (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160.77, 152.83, 150.64, 108.51, 105.58, 99.99, 53.37 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>ON<sub>3</sub>Br+H]<sup>+</sup> 227.97670, gefunden 227.97738, berechnet für [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>ON<sub>3</sub><sup>81</sup>Br+H]<sup>+</sup> 229.97465, gefunden 229.97460.



### 6-Brom-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**16**)

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid, 60% in Paraffinöl (38.9 mg, 1.0 mmol, 1.30 eq) in DMF (20 mL) wurde bei 0 °C Verbindung **15** (170.6 mg, 0.8 mmol, 1.00 eq) gegeben und 30 min gerührt. Es wurde 2-(Trimethylsilyl)ethoxymethylchlorid (135.1 µL, 0.8 mmol, 1.02 eq) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gegeben, NaCl zugefügt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als klares Öl.

**Ausbeute:** 67% (181.6 mg, 0.5 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.47 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 0.82 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.11 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161.11, 152.52, 151.20, 112.36, 105.05, 101.61, 71.33, 65.79, 53.75, 17.03, -1.42 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>BrSi+H]<sup>+</sup> 358.05809, gefunden 358.05953, berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub><sup>81</sup>BrSi+H]<sup>+</sup> 360.05605, gefunden 360.05596.

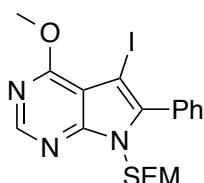


### 4-Methoxy-6-phenyl-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**17**)

Eine Lösung aus Verbindung **16** (247.5 mg, 0.7 mmol, 1.00 eq), Phenylboronsäure (101.1 mg, 0.8 mmol, 1.2 eq) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (111.9 mg, 1.0 mmol, 1.50 eq) in DMF:Wasser (10:2 mL) wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit Argon entgast. Es wurde dann Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (119.7 mg, 103.6 µmol, 0.15 eq) zugegeben und bei 80 °C über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gegeben, NaCl zugefügt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als klares Öl.



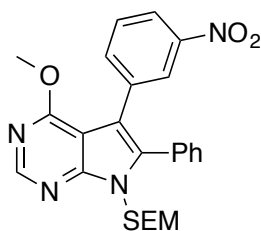
**Ausbeute:** 84% (207.8 mg, 0.6 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.50 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.57–7.42 (m, 3H), 6.74 (s, 1H), 5.59 (s, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.59 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.83 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.11 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.10, 153.73, 150.94, 139.66, 130.94, 128.86, 128.82, 128.68, 104.59, 98.37, 70.69, 65.91, 53.61, 17.26, -1.46 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Si+H]<sup>+</sup> 356.17888, gefunden 356.17975.



**5-Iodo-4-methoxy-6-phenyl-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (18)**

Eine Lösung aus Verbindung **17** (189.2 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) und *N*-Iodsuccinimid (179.6 mg, 0.8 mmol, 1.5 eq) in MeCN (6 mL) wurde bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (3 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser gegeben, NaCl zugefügt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als klares Öl.

**Ausbeute:** 97% (249.8 mg, 0.52 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.51 (s, 1H), 7.54 (s, 5H), 5.44 (s, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.40 (t, 2H), 0.73 (t, 2H), -0.14 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.09, 152.77, 151.16, 140.47, 130.94, 130.24, 129.30, 128.44, 106.58, 71.23, 65.86, 54.94, 53.85, 17.15, -1.48 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>ISi+H]<sup>+</sup> 482.07552, gefunden 482.07424.

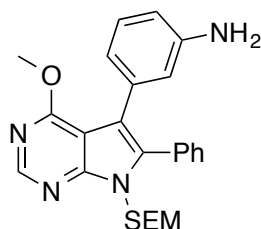


**4-Methoxy-5-(3-nitrophenyl)-6-phenyl-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (19)**

Eine Lösung aus Verbindung **18** (226.7 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq), *m*-Nitrophenylboronsäure (94.3 mg, 0.6 mmol, 1.20 eq) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (76.3 mg, 0.7 mmol, 1.50 eq) in DMF:Wasser (2.5:0.5 mL) wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit Argon entgast. Es wurde dann Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (81.6 mg, 70.6 μmol) zugegeben und bei 80 °C über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung

wurde in wässrige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gegeben,  $\text{NaCl}$  zugefügt und mit  $\text{EtOAc}$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

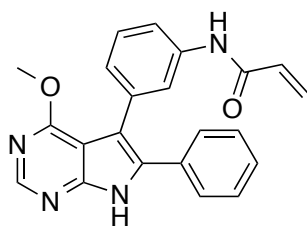
**Ausbeute:** 89% (201.9 mg, 0.4 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.57 (s, 1H), 8.08 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.07–8.03 (m, 1H), 7.63–7.57 (m, 1H), 7.51 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.45–7.38 (m, 5H), 5.51 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.49 (t, 2H), 0.78 (t, 2H), -0.11 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.45, 152.49, 151.30, 147.12, 136.99, 136.92, 134.98, 131.07, 129.06, 128.89, 128.55, 125.11, 121.11, 111.64, 103.00, 70.62, 65.88, 59.66, 53.66, 17.19, -1.55 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  477.19526, gefunden 477.19402.



**3-(4-Methoxy-6-phenyl-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (20)**

Eine Lösung aus Verbindung **19** (168.8 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq), Ammoniumformiat (178.7 mg, 2.83 mmol, 8.0 eq) und Palladium, 5% auf Aktivkohle (75.4 mg, 35.4 mmol, 0.1 eq) in Ethanol (10 mL) wurde bei 90 °C bis zur vollständigen Umsetzung (1 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert, in wässrige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gegeben,  $\text{NaCl}$  zugefügt und mit  $\text{EtOAc}$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

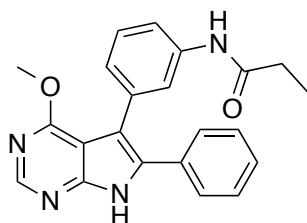
**Ausbeute:** Quantitativ (160.2 mg, 0.4 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.50 (s, 1H), 7.37 (s, 5H), 6.84 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.51 (t, 1H), 6.43–6.39 (m, 1H), 6.33–6.29 (m, 1H), 5.47 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.48 (t, 2H), 0.78 (t, 2H), -0.11 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.59, 152.30, 150.73, 147.69, 135.36, 133.80, 130.91, 130.13, 128.31, 128.08, 127.69, 118.70, 116.71, 114.80, 112.35, 103.51, 70.54, 65.73, 53.46, 17.21, -1.53 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  447.22108, gefunden 447.22057.



***N*-(3-(4-Methoxy-6-phenyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-acrylamid (21a)**

Zu einer Lösung aus Verbindung **20** (50.0 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (195.0  $\mu$ L, 1.1 mmol, 10.0 eq) in THF (2.5 mL) wurde bei 0 °C Acryloylchlorid (10.0  $\mu$ L, 0.1 mmol, 1.1 eq) gegeben und bis zur vollständigen Umsetzung (2.5 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben, NaCl zugefügt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Zwischenprodukt als klares Öl. Dieses wurde umgehend in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) gelöst, bei 0 °C Trifluoressigsäure (0.5 mL) zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (1 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben, NaCl zugefügt und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Aufreinigung mittels präparativer HPLC und anschließende Extraktion mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1) lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 54% (20.8 mg, 56.2  $\mu$ mol) über zwei Schritte. **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.57 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.30–7.23 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.21 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.70 (dd, *J* = 10.2, 1.7 Hz, 1H), 5.32 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.88 ppm (s, 3H). **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 371.15025, gefunden 371.15003.

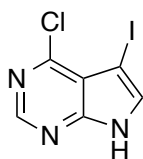


***N*-(3-(4-Methoxy-6-phenyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-propionamid (21b)**

Zu einer Lösung aus Verbindung **20** (50.0 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (195.0  $\mu$ L, 1.1 mmol, 10.0 eq) in THF (2.5 mL) wurde bei 0 °C Propionylchlorid (10.1  $\mu$ L, 0.1 mmol, 1.1 eq) gegeben und bei

Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (2.5 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben,  $\text{NaCl}$  zugefügt und mit  $\text{EtOAc}$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Zwischenprodukt als klares Öl. Dieses wurde umgehend in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) gelöst, bei 0 °C Trifluoressigsäure (0.5 mL) zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (1 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in wässrige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben,  $\text{NaCl}$  zugefügt und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Aufreinigung mittels präparativer HPLC und anschließende Extraktion mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (9:1) lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

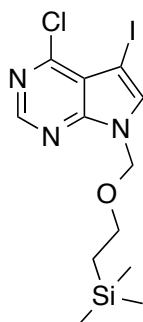
**Ausbeute:** 45% (20.2 mg, 54.2  $\mu\text{mol}$ ) über zwei Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10.10 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.66 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.32–7.19 (m, 5H), 6.90 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.33–2.25 (m, 2H), 1.06–1.02 ppm (m, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4+\text{H}]^+$  373.16590, gefunden 373.16541.



#### 4-Chlor-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine

*N*-Iodosuccinimid (12.3 g, 54.7 mmol, 1.05 eq) in 20 mL DMF wurde innerhalb von 15 min zu einer Lösung aus 4-Chlor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (**22**) (8.00 g, 52.1 mmol, 1.00 eq) in 80 mL DMF gegeben. Die Reaktion wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung gerührt (16 h). Anschließend wurde  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben, die Reaktionsmischung mit  $\text{EtOAc}$  verdünnt und Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit  $\text{EtOAc}$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung als weißer Feststoff isoliert werden.

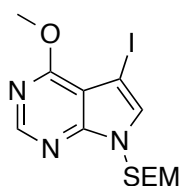
**Ausbeute:** 97% (14.1 g, 50.5 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.95 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.93 ppm (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  151.5, 150.8, 150.5, 133.9, 115.8, 51.7 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{I}+\text{H}]^+$  280.47, gefunden 280.18.



#### 4-Chlor-5-iod-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin (23)

Natriumhydrid, 60% in Paraffinöl (465.5 mg, 14.0 mmol, 1.3 eq) wurde unter Argonatmosphäre in THF (25 mL) gelöst, 4-Chlor-5-iod-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (3.5 g, 9.0 mmol, 1.0 eq) zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Danach wurde SEM-Cl (1.74 mL, 11.8 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser (20 mL) gegeben und mit EtOAc (3x70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

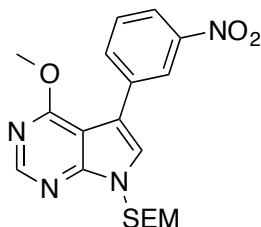
**Ausbeute:** 79% (2.9 g, 7.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.69 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 3.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.81 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.10 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 151.19, 151.09, 150.91, 136.64, 116.26, 72.95, 66.09, 52.93, 17.07, -1.39 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ON<sub>3</sub>ClISi+H]<sup>+</sup> 409.99469, gefunden 409.99444, berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ON<sub>3</sub><sup>37</sup>ClISi+H]<sup>+</sup> 411.99174, gefunden 411.99101.



#### 5-Iodo-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin (24)

Eine Lösung aus **23** (2.8 g, 6.9 mmol) und NaOMe (12 mL) in MeOH (18 mL) wurde bis zur vollständigen Umsetzung über Nacht bei 70 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Wasser gegeben, NaCl zugegeben, mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung als weißer Feststoff isoliert werden.

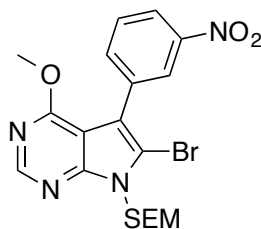
**Ausbeute:** 99% (2.8 g, 6.9 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.46 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 5.54 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.49 (t, 2H), 0.81 (t, 2H), -0.10 ppm (d, *J* = 3.2 Hz, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.33, 151.89, 151.29, 132.30, 106.34, 72.55, 65.75, 53.76, 50.90, 17.07, -1.40 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Si+H]<sup>+</sup> 406.04422, gefunden 406.04320.



#### 4-Methoxy-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (25)

Eine Lösung aus **24** (2.2 g, 5.5 mmol, 1.0 eq), *m*-Nitrophenylboronsäure (1.1 g, 6.6 mmol, 1.2 eq), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (887.4 mg, 8.2 mmol, 1.5 eq) und Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (949.4 mg, 0.8 mmol, 0.15 eq) in MeCN:H<sub>2</sub>O (14:7 mL) wurde 3 h bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung überführt, NaCl zugefügt, mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als Öl.

**Ausbeute:** 55% (1.2 g, 3.0 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.61 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.58, 152.82, 151.38, 147.92, 135.26, 134.40, 129.76, 126.93, 122.68, 121.04, 113.80, 102.19, 72.84, 65.88, 53.86, 17.11, -1.38 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>Si+H]<sup>+</sup> 401.16396, gefunden 401.16270.

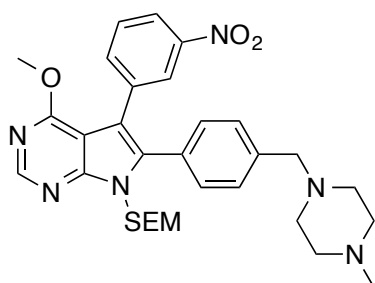


#### 6-brom-4-methoxy-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin

Verbindung **25** (1.1 g, 2.7 mmol, 1.0 eq) wurde in MeCN (8 mL) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (581.5 mg, 3.3 mmol, 1.2 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend

wurde die Reaktionsmischung in Wasser überführt, NaCl zugegeben, mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelblichen Feststoff.

**Ausbeute:** 85% (1.1 g, 2.3 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.55 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 3.94 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 3.61 (dd, *J* = 11.1, 4.5 Hz, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 0.08 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.42, 153.30, 152.51, 148.27, 137.72, 134.62, 130.30, 125.69, 123.04, 114.38, 113.67, 104.24, 72.74, 66.88, 54.74, 17.96, -0.54 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>BrSi+H]<sup>+</sup> 479.07447, gefunden 479.07487, berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub><sup>81</sup>BrSi+H]<sup>+</sup> 481.07242, gefunden 481.07180.



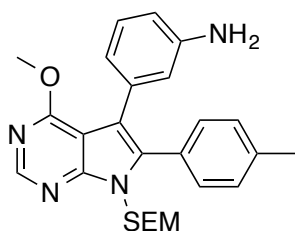
**4-methoxy-6-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (26)**

Eine Lösung aus 6-brom-4-methoxy-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (342.0 mg, 0.7 mmol, 1.00 eq), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (116.0 mg, 1.1 mmol, 1.50 eq) und 4-(4-methylpiperazin)methylphenylboronsäure Pinacolester (271.8 mg, 0.9 mmol, 1.20 eq) in Dioxan:H<sub>2</sub>O (5:1) wurde für 30 min mit Argon entgast. Nach Zugabe von Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (124.1 mg, 0.1 mmol, 0.15 eq) wurde die Reaktionsmischung 2 d bei 80 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben, mit 10% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, die organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als Öl.

**Ausbeute:** 50% (213.2 mg, 0.4 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.57 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 4H), 5.52 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.47 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 8H), 2.16 (s, 3H), 0.78 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), -0.12 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.42, 152.49, 151.27, 147.09, 139.47, 137.12, 136.96, 135.00, 130.91, 130.05, 128.97, 127.60, 124.97, 121.08, 114.94, 111.59, 102.98, 73.48,

70.66, 65.90, 61.56, 54.62, 53.69, 52.41, 48.55, 45.60, 24.90, 17.19, -1.52 ppm.

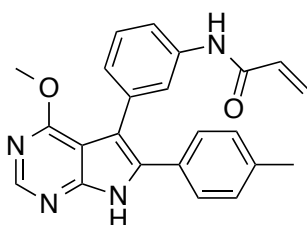
**HRMS:** m/z berechnet für  $[C_{31}H_{40}O_4N_6Si+H]^+$  589.29531, gefunden 589.29592.



**3-(4-methoxy-6-(*p*-tolyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)aniline (27)**

Verbindung **26** (543.0 mg, 0.9 mmol, 1.0 eq), Ammoniumformiat (465.3 mg, 7.4 mmol, 8.0 eq) und 5% Palladium auf Aktivkohle (196.3 mg, 92.2  $\mu$ mol, 0.1 eq) wurde in EtOH (30 mL) gelöst und für 1.5 h bei 90 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert, im Vakuum eingeeengt und anschließend in Wasser gegeben und mit 5% MeOH in  $CH_2Cl_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und anschließend säulenchromatographisch Aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 89% (380.0 mg, 0.8 mmol).  **$^1H$  NMR** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.49 (s, 1H), 7.26 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.18 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 6.85 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 6.51–6.48 (m, 1H), 6.42–6.38 (m, 1H), 6.32–6.29 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.89 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.52–3.43 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 0.91–0.65 (m, 2H), -0.11 ppm (s, 9H).  **$^{13}C$  NMR** (126 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  162.50, 152.26, 150.63, 147.68, 137.72, 135.45, 133.95, 130.79, 128.76, 127.74, 127.15, 118.72, 116.70, 114.56, 112.31, 103.54, 70.50, 65.74, 53.47, 20.81, 17.22, -1.51 ppm. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{26}H_{32}O_2N_4Si+H]^+$  461.24, gefunden 461.09.



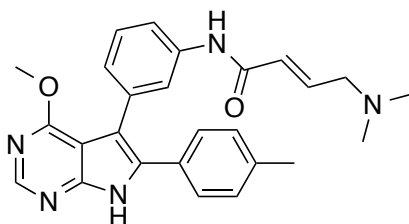
**N-(3-(4-methoxy-6-(*p*-tolyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (28a)**

Zu einer Lösung aus dem Amin **27** (70.0 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in trockenem THF (1 mL) wurde DIPEA (260.1  $\mu$ L, 1.5 mmol, 10.0 eq) zugegeben. Bei 0 °C wurde anschließend eine Lösung aus Acryloylchlorid (13.6  $\mu$ L, 0.2 mmol, 1.1 eq) in THF (1 mL) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 0 °C bis zum



vollständigen Umsatz gerührt (1 h). Nach Beendigung der Reaktion wurde  $\text{NaHCO}_3$  zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 5% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und mit 1 mL TFA versetzt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 2 mL THF aufgenommen und mit 1 mL NaOH (2 M) versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 5% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 29% (17.2 mg, 44.7  $\mu\text{mol}$ ) über drei Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.45 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.1$  Hz, 3H), 7.13 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.42 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.28 ppm (s, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4+\text{H}]^+$  385.16590, gefunden 385.16649.

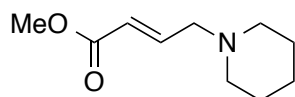


#### 4-(dimethylamino)-*N*-(3-(4-methoxy-6-(*p*-tolyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)but-2-enamid (28b)

4-(dimethylamino)crotonsäure (50.3 mg, 0.3 mmol, 2 eq) wurde in THF (1.5 mL) gelöst und bei 0 °C Oxalylchlorid (38.6 mg, 0.3 mmol, 2 eq) zugegeben. Drei Tropfen einer Lösung aus 5 Tropfen DMF in 1 mL THF wurden der Reaktion beigemischt und bei 0 °C gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung bei 0 °C zu einer Mischung aus Verbindung **27** (70.0 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in THF (1.5 mL) und *N*-methylpyrrolidinon (0.75 mL) gegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde NaOH zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und mit 1 mL TFA versetzt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 2 mL THF aufgenommen und mit 1 mL NaOH (2 M) versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

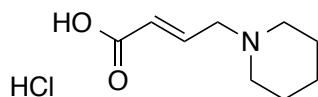
**Ausbeute:** 75% (50.8 mg, 0.1 mmol) über drei Schritte. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.45 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.26 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.70 (dt, *J* = 15.4, 5.9 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.06 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.18 ppm (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.08, 162.43, 152.19, 150.49, 138.81, 137.28, 135.00, 132.89, 128.98, 128.27, 128.17, 128.07, 126.71, 126.16, 125.92, 121.52, 117.56, 111.30, 104.63, 59.58, 53.22, 45.00, 20.71 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>+H]<sup>+</sup> 442.22375, gefunden 442.22377, berechnet für [C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>+Na]<sup>+</sup> 464.20570, gefunden 464.20553.



#### 4-(piperidin-1-yl)but-2-ensäuremethylester

Eine Lösung aus 4-brombut-2-ensäuremethylester (2.0 g, 11.2 mmol, 1.0 eq), Piperidin (1.1 g, 12.3 mmol, 1.1 eq) und DIPEA (1.63 mL, 12.3 mmol, 1.1 eq) in THF (15 mL) wurde für 16 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbliches Öl.

**Ausbeute:** 75% (1.3 g, 7.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.98 (dt, *J* = 15.7, 6.3 Hz, 1H), 5.97 (dt, *J* = 15.7, 1.6 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.10 (dd, *J* = 6.3, 1.5 Hz, 2H), 2.39 (s, 4H), 1.63–1.54 (m, 4H), 1.47–1.39 ppm (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.83, 146.08, 122.84, 77.16, 60.24, 54.84, 51.65, 26.08, 24.25 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N+H]<sup>+</sup> 184.13, gefunden 185.98.

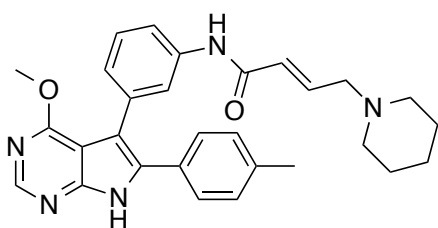


#### 4-(piperidin-1-yl)but-2-ensäure Hydrochlorid

4-(piperidin-1-yl)but-2-ensäuremethylester (1.3 g, 6.8 mmol, 1.0 eq) wurde in 15 mL wässriger HCl-Lösung (1 M) gelöst und unter Reflux erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde Toluol zugegeben, die Phasen getrennt und die

organische Phase eingengt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung erhalten.

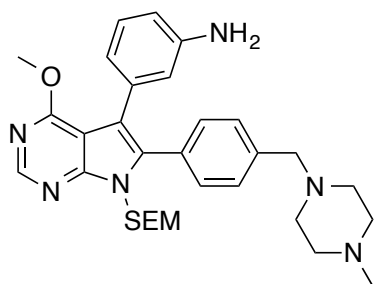
**Ausbeute:** 75% (1.1 g, 5.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.73 (s, 1H), 10.98 (d, *J* = 184.6 Hz, 1H), 6.95–6.82 (m, 1H), 6.17 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 3.85 (s, 2H), 2.83 (s, 2H), 1.78 (s, 4H), 1.69 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 1.37 ppm (d, *J* = 5.4 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 165.86, 135.63, 129.26, 55.55, 51.78, 22.21, 21.16 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N+H]<sup>+</sup> 170.12, gefunden 170.03.



***N*-(3-(4-methoxy-6-(*p*-tolyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-4-(piperidin-1-yl)but-2-enamid (28c)**

4-(piperidin-1-yl)but-2-ensäure Hydrochlorid (44.6 mg, 0.2 mmol, 2 eq) wurde in THF (1.5 mL) gelöst und bei 0 °C Oxalylchlorid (27.6 mg, 0.2 mmol, 2 eq) zugegeben. Drei Tropfen einer Lösung aus 5 Tropfen DMF in 1 mL THF wurden der Reaktion beigemischt und bei 0 °C gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung bei 0 °C zu einer Mischung aus Verbindung **16** (50.0 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in THF (1.0 mL) und *N*-methylpyrrolidinon (0.5 mL) gegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde NaOH zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 10% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 1 mL TFA versetzt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt, der Rückstand in 2 mL THF aufgenommen und mit 1 mL NaOH (2 M) versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 10% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

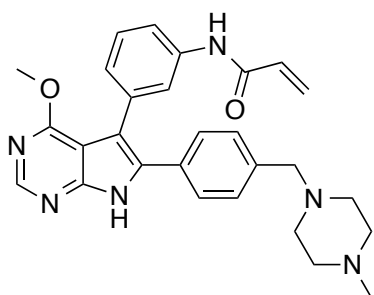
**Ausbeute:** 19% (10.2 mg, 21.2 μmol) über drei Schritte. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.47 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.27 (dd, *J* = 7.9, 5.2 Hz, 3H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.63–1.32 ppm (m, 9H). **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>+H]<sup>+</sup> 482.25505, gefunden 482.25507.



**3-(4-methoxy-6-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-7-((2-(tri-methylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (29)**

Verbindung **26** (173.2 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq), Ammoniumformiat (148.4 mg, 2.4 mmol, 8.0 eq) und 5% Palladium auf Aktivkohle (62.6 mg, 29.4  $\mu$ mol, 0.1 eq) wurde in Ethanol (10 mL) gelöst und für 1.5 h bei 90 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert, im Vakuum eingeeengt und anschließend in Wasser gegeben, NaCl zugegeben und mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, im Vakuum eingeeengt und anschließend säulenchromatographisch Aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 74% (122.3 mg, 0.2 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.49 (s, 1H), 7.30 (q,  $J$  = 8.0 Hz, 4H), 6.83 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.39 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 6.29 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 4.91 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.46 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.37 (s, 8H), 2.17 (s, 3H), 0.76 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.13 ppm (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.59, 152.31, 150.79, 147.80, 135.38, 133.88, 130.81, 128.62, 127.79, 118.73, 116.73, 114.75, 112.36, 103.55, 70.62, 68.61, 65.82, 61.65, 54.62, 53.59, 52.44, 48.63, 45.58, 17.23, -1.43 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_2\text{Si}+\text{H}]^+$  559.32, gefunden 559.11.

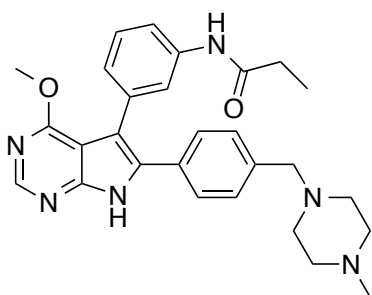


**N-(3-(4-methoxy-6-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-7-((2-(tri-methylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (30a)**

Verbindung **29** (50.0 mg, 84.9  $\mu$ mol, 1.0 eq) wurde in THF (2 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde DIPEA (147.8  $\mu$ L, 0.8 mmol, 10.0 eq) und Acryloylchlorid (7.5  $\mu$ L, 93.4  $\mu$ mol, 1.1 eq) zugefügt und für 3 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung überführt und mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Dieses wurde umgehend in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) gelöst, bei 0 °C wurden 0.5 mL TFA zugegeben und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (1.5 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung überführt, mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** quant. (44.4 mg, 92.0  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.49 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.32–7.22 (m, 3H), 7.00 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 3.31 (s, 4H), 2.45 ppm (s, 4H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  483.25030, gefunden 483.25029.

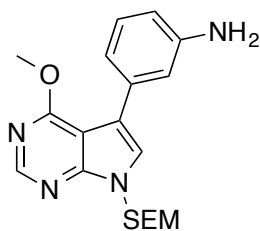


***N*-(3-(4-methoxy-6-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-7-((2-(triethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)propionamid (30b)**

Verbindung **29** (50.0 mg, 84.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurde in THF (2 mL) gelöst und bei 0 °C DIPEA (147.8  $\mu\text{L}$ , 0.8 mmol, 10.0 eq) und Propionylchlorid (7.7  $\mu\text{L}$ , 93.4  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) zugegeben und für 2.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung überführt und mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Dieses wurde umgehend in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) gelöst, bei 0 °C wurden 0.5 mL TFA zugegeben und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (1.5 h) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung überführt, mit 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 99% (47.3 mg, 84.6  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.45 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.23 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 6.93 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.39 (s, 8H), 2.28 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.05 ppm (td,  $J = 7.3, 3.0$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171.89, 162.51, 158.00, 157.75, 152.20, 150.57, 139.00, 134.83, 129.85, 128.74, 128.07, 127.96, 125.45, 121.37, 118.41, 116.02,

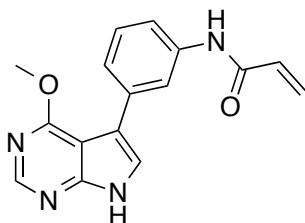
111.77, 104.68, 61.39, 54.35, 53.21, 48.55, 29.47, 9.63 ppm. **HRMS:** m/z berechnet für  $[C_{28}H_{32}O_2N_6Si+H]^+$  485.26595, gefunden 485.26584.



### 3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin

Eine Lösung aus **14** (1.6 g, 4.0 mmol, 1.0 eq), Eisenpulver (1.1 g, 20.0 mmol, 5.0 eq) und  $NH_4Cl$  (2.1 g, 40.0 mmol, 10 eq.) in EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1) wurde für 3 h auf 60 °C im Ultraschallbad erhitzt, währenddessen färbte sich die Reaktionsmischung braun. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und der Durchfluss im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mit  $CH_2Cl_2$  und Wasser aufgenommen und die Phasen getrennt. Die organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flashsäulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als hellbraunes Öl.

**Yield:** 87% (1.3 g, 3.5 mmol) **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.49 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (dd [app. t],  $J$  = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.06 (ddd,  $J$  = 8.0, 1.2, 0.8 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.87 (br s, 2H), 3.56 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 0.92 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.06 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.48, 153.01, 151.26, 146.01, 134.94, 129.12, 123.65, 119.53, 118.02, 115.80, 113.83, 103.37, 73.06, 66.49, 53.72, 17.76, -1.39 ppm. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{19}H_{26}N_4O_2Si+H]^+$  371.19, gefunden 371.24.

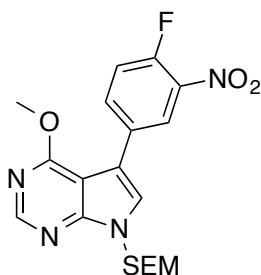


### N-(3-(4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamide (32)

Zu einer Lösung aus 3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)aniline (83.0 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) und DIPEA (390  $\mu$ L, 2.2 mmol, 10.0 eq) in THF (2.5 mL) wurde das in THF (1.0 mL) gelöste Acryloylchlorid (28.0  $\mu$ L, 0.33 mmol, 1.5 eq) bei 0 °C zugetropft. Die Reaktion wurde für 3 h gerührt, mit  $NaHCO_3$ -Lösung gequentscht und mit  $CH_2Cl_2$  extrahiert.

Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) gelöst und bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure (5 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingeeengt und in THF (10 mL) aufgenommen. Anschließend wurde bei Raumtemperatur eine wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für 1 h gerührt. Das Gemisch wird mit Salzsäure (1 M) neutralisiert und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

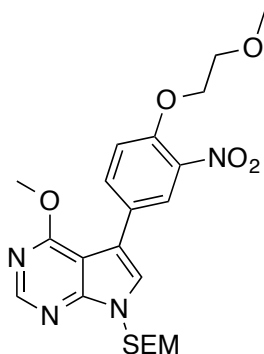
**Ausbeute:** 60% (39 mg, 0.1 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.30 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.31–7.39 (m, 2H), 6.49 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 16.9, 2.0$  Hz, 1H), 5.74–5.79 (m, 1H), 4.02 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  163.60, 163.08, 153.58, 151.09, 139.36, 135.37, 132.48, 128.90, 127.26, 124.22, 122.83, 120.08, 117.67, 116.14, 102.41, 53.84 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2+\text{H}]^+$  295.11950, gefunden 295.11866.



#### 5-(4-fluor-3-nitrophenyl)-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (34)

5-iod-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**24**) (1.0 g, 2.5 mmol, 1.0 eq.), (4-fluor-3-nitrophenyl)boronsäure (547.5 mg, 3.0 mmol, 1.2 eq),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (570.2 mg, 0.5 mmol, 0.2 eq) und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (653.8 mg, 6.2 mmol, 2.5 eq.) wurden unter Ar-Atmosphäre in einem Schlenk-Röhrchen vorgelegt und *Freeze-pump-thaw*-entgastes Dioxan: $\text{H}_2\text{O}$  (3:1) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (16 h) bei 80 °C gerührt, wobei sie sich rot-braun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss in EtOAc und Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

**Ausbeute:** 86% (890.1 mg, 2.2 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.50 (s, 1H), 8.49 (dd,  $J = 7.3, 2.2$  Hz, 1H), 8.09 (ddd,  $J = 8.8, 3.9, 2.4$  Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.62 (dd,  $J = 11.1, 8.8$  Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.56 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.84 (t,  $J = 8.0$ , 2H), -0.09 ppm (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.5, 152.7, 151.3, 136.6, 135.5, 130.9, 126.7, 125.2, 118.4, 118.3, 112.9, 102.1, 72.8, 65.9, 53.8, 17.1, -1.45 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  419.15, gefunden 419.15.

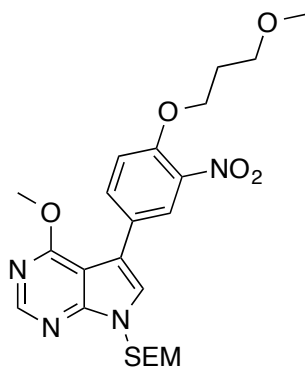


**4-methoxy-5-(4-(2-methoxyethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (35a)**

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid, 60% Dispersion in Paraffinöl (100.0 mg, 2.5 mmol, 2.4 eq) in THF wurde über 5 min tropfenweise eine Lösung aus 2-methoxyethan-1-ol (800.0 mg, 10.5 mmol, 10.0 eq) in THF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt, über 10 min tropfenweise eine Lösung aus Verbindung **34** (440.0 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq) in THF (100 mL) zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (16 h). Die Reaktionsmischung wurde dann mit Wasser und EtOAc verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl

**Ausbeute:** 71% (354.0 mg, 0.7 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.51 (s, 1H), 8.23 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.14 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 4.29 (t,  $J = 4.9$ , 2H), 4.10 (s, 3H), 3.82 (t,  $J = 5.0$ , 2H), 3.56 (t,  $J = 8.2$ , 2H), 3.46 (s, 3H), 0.92 (t,  $J = 8.0$ , 2H), -0.06 ppm (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.41, 152.95, 151.59, 151.18, 139.89, 133.99, 127.05, 125.97, 123.69, 115.49, 115.05, 103.21, 73.24, 70.79, 69.82, 66.76, 59.62, 54.05, 17.80, -1.34 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  475.20, gefunden 474.95.

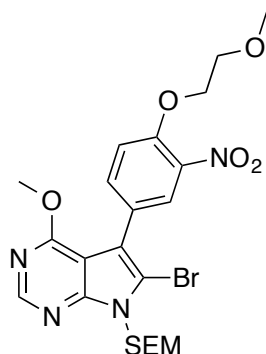




**4-methoxy-5-(4-(3-methoxypropoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (35b)**

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid, 60% Dispersion in Paraffinöl (115.2 mg, 2.9 mmol, 2.4 eq) in THF wurde über 5 min tropfenweise eine Lösung aus 2-methoxyethan-1-ol (1.1 g, 11.9 mmol, 10.0 eq) in THF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt, über 10 min tropfenweise eine Lösung aus Verbindung **34** (500.0 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) in THF (110 mL) zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (16 h). Die Reaktionsmischung wurde dann mit Wasser und EtOAc verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

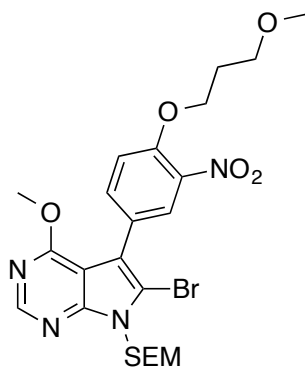
**Ausbeute:** 73% (426.0 mg, 0.9 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.68 (dq, *J* = 12.7, 6.3 Hz, 2H), 4.12 (s, 3H), 3.66 (dd, *J* = 10.4, 6.5 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.40 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 0.93 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), -0.05 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.48, 152.93, 151.54, 150.48, 141.04, 133.65, 127.00, 125.77, 123.73, 116.80, 115.70, 103.29, 76.52, 76.07, 73.34, 66.82, 59.60, 54.13, 17.87, 17.12, -1.31 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si+H]<sup>+</sup> 489.22, gefunden 488.99.



**6-brom-4-methoxy-5-(4-(2-methoxyethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin**

Eine Lösung von *N*-bromsuccinimid (51.2 mg, 0.3 mmol, 1.05 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde über 5 min tropfenweise zu einer Lösung aus Verbindung **35a** (130.0 mg, 0.3 mmol, 1.00 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde im dunkeln bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (16 h) und färbte sich währenddessen orange-braun. Es wurde eine wässrige Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung (10 mol%) zugegeben, wobei die Lösung klar wurde. Die Reaktionsmischung wurde dann mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Wasser verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

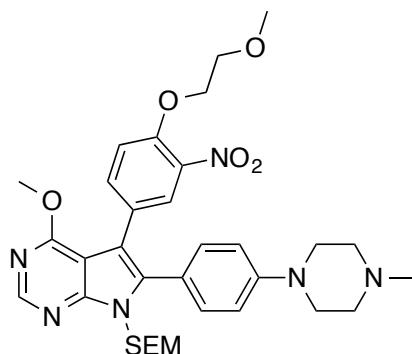
**Ausbeute:** 75% (114.0 mg, 0.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.50 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 4.32 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.84 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.64 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.49 (s, 3H), 0.95 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), -0.04 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.24, 152.71, 151.62, 151.61, 139.64, 136.03, 128.06, 125.35, 114.39, 114.35, 111.88, 104.38, 72.21, 70.80, 69.80, 66.98, 59.69, 54.25, 17.89, -1.30. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si+H]<sup>+</sup> 553.11, gefunden 552.89.



**6-brom-4-methoxy-5-(4-(3-methoxypropoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin**

Eine Lösung von *N*-bromsuccinimid (110.2 mg, 0.6 mmol, 1.05 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde über 5 min tropfenweise zu einer Lösung aus Verbindung **35b** (288.0 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde im dunkeln bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (16 h) und färbte sich währenddessen orange-braun. Es wurde eine wässrige Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung (10 mol%) zugegeben, wobei die Lösung klar wurde. Die Reaktionsmischung wurde dann mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Wasser verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

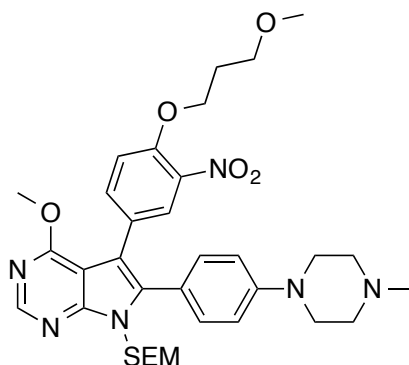
**Ausbeute:** 71% (237.2 mg, 0.4 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.53 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.77 (td, *J* = 6.3, 4.4 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.72 (dd, *J* = 10.4, 6.6 Hz, 1H), 3.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.61 (dd, *J* = 10.4, 4.1 Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 1.46 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.00 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 0.00 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.24, 152.79, 151.72, 150.85, 140.48, 135.73, 127.85, 125.17, 115.80, 114.32, 111.75, 104.32, 76.31, 76.02, 72.12, 66.94, 59.62, 54.13, 17.85, 17.08, -1.31. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si+H]<sup>+</sup> 567.13, gefunden 567.26.



**4-methoxy-5-(4-(2-methoxyethoxy)-3-nitrophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin**

6-brom-4-methoxy-5-(4-(2-methoxyethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (314.0 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq), 4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenylboronsäure Pinacolester (205.0 mg, 0.7 mmol, 1.2 eq),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (138.7 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq) und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (159.0 mg, 1.5 mmol, 2.5 eq) wurden unter Ar-Atmosphäre in einem Schlenk-Röhrchen vorgelegt und 3 mL *Freeze-pump-thaw*-entgastes Dioxan: $\text{H}_2\text{O}$  (3:1) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (16 h) bei 80 °C gerührt, wobei sie sich rot-braun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss in EtOAc und Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die vereinigen organische Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

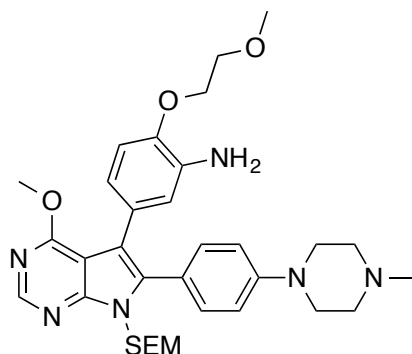
**Ausbeute:** 91% (335 mg, 0.5 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.51 (s, 1H), 7.88 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.23 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.79 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.66 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 3.46 (s, 3H), 3.40 (s, 4H), 2.76 (s, 4H), 2.49 (s, 3H), 0.94 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), -0.04 (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.03, 153.07, 151.25, 150.64, 139.43, 137.09, 136.46, 132.45, 129.37, 128.36, 127.17, 116.65, 115.56, 114.02, 111.46, 104.08, 70.95, 70.77, 69.52, 66.80, 59.67, 54.71, 54.52, 53.86, 47.62, 18.10, -1.27. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  649.32, gefunden 649.58.



**4-methoxy-5-(4-(3-methoxypropoxy)-3-nitrophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin**

6-brom-4-methoxy-5-(4-(2-methoxypropoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (240.0 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq), 4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenylboronsäure Pinacolester (153.4 mg, 0.5 mmol, 1.2 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (92.4 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (106.0 mg, 1.0 mmol, 2.5 eq) wurden unter Ar-Atmosphäre in einem Schlenk-Röhrchen vorgelegt und 3 mL *Freeze-pump-thaw*-entgastetes Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (16 h) bei 80 °C gerührt, wobei sie sich rot-braun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss in EtOAc und Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die vereinigen organische Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

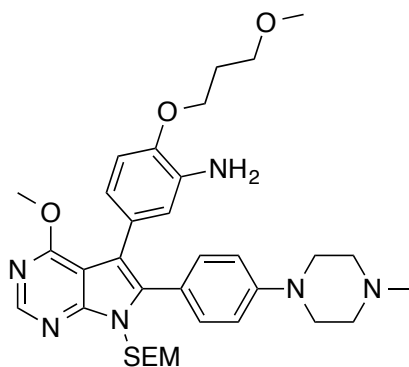
**Ausbeute:** 94% (264 mg, 0.4 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (t, 1H), 7.83 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.62 (dd, *J* = 10.6, 6.3 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.65 (dd, *J* = 10.4, 6.4 Hz, 1H), 3.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.52 (dd, *J* = 10.4, 4.0 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.37 (s, 4H), 2.85 (s, 3H), 2.54 (s, 4H), 1.36 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 0.94 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), -0.04 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.03, 153.07, 151.24, 149.84, 140.44, 137.03, 136.12, 132.48, 129.39, 128.15, 127.00, 120.68, 116.70, 115.60, 111.54, 104.06, 76.05, 76.01, 70.94, 66.80, 59.60, 54.67, 53.87, 48.41, 47.60, 18.11, 17.02, -1.27. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Si+H]<sup>+</sup> 663.33, gefunden 663.58.



**5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)anilin**

Eine Lösung aus 4-methoxy-5-(4-(2-methoxyethoxy)-3-nitrophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (350.0 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq), Eisenpulver (150.6 mg, 2.7 mmol, 5.0 eq) und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (288.5 mg, 5.4 mmol, 10.0 eq.) in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1) wurde für 3 h auf 60 °C im Ultraschallbad erhitzt, wobei sich die Reaktionsmischung dunkelbraun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert, mit MeOH gewaschen und der Durchfluss im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

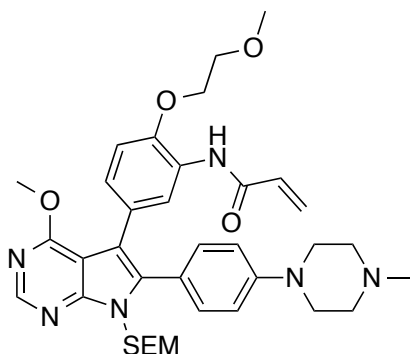
**Ausbeute:** 84% (334 mg, 0.5 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.48 (s, 1H), 7.29 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.69 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 6.67 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.58 (dd,  $J$  = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 4.13 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.75 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.65 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.33 (s, 4H), 2.70 (s, 4H), 2.44 (s, 3H), 0.93 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), -0.05 (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.21, 152.98, 150.73, 150.37, 145.26, 136.15, 135.71, 132.39, 127.43, 121.59, 118.51, 115.39, 115.32, 114.13, 111.61, 104.60, 71.38, 70.95, 67.98, 66.61, 59.27, 54.87, 53.75, 47.98, 45.78, 18.13, -1.28. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  619.34, gefunden 619.44.



**5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-(3-methoxypropoxy)anilin**

Eine Lösung aus 4-methoxy-5-(4-(3-methoxypropoxy)-3-nitrophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (280.0 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq), Eisenpulver (118.0 mg, 2.1 mmol, 5.0 eq) und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (226.0 mg, 4.2 mmol, 10.0 eq) in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1) wurde für 3 h auf 60 °C im Ultraschallbad erhitzt, wobei sich die Reaktionsmischung dunkelbraun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert, mit MeOH gewaschen und der Durchfluss im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausblick:** 84% (225 mg, 0.4 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.46 (s, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.82 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.68 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.55 (dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.40 (dd,  $J = 10.6, 6.2$  Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.80 (br s, 2H), 3.62 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.57 (dd,  $J = 10.1, 6.3$  Hz, 1H), 3.45 (dd,  $J = 10.1, 4.2$  Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.25 (s, 4H), 2.59 (s, 4H), 2.36 (s, 3H), 1.30 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 0.91 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.09, 152.89, 150.61, 150.53, 144.02, 136.91, 136.16, 132.29, 127.80, 121.41, 121.20, 118.69, 115.08, 114.65, 114.00, 104.50, 76.19, 74.39, 70.87, 66.51, 59.30, 54.97, 53.65, 48.15, 46.00, 18.04, 17.33, -1.35. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  633.36, gefunden 633.31.

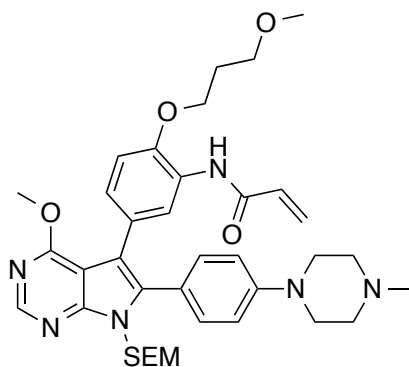


***N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus 5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)anilin (200.0 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) und  $K_2CO_3$  (98.3 mg, 0.7 mmol, 2.2 eq) in THF wurde bei 0 °C über 15 min tropfenweise eine Lösung aus Acryloylchlorid (31.6  $\mu$ L, 0.4 mmol, 1.2 eq) in THF (1 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (12 h). Die Mischung wurde anschließend mit EtOAc und Wasser verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer HCl-Lösung (1 M), wässrigen  $NaHCO_3$ -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 79% (172.0 mg, 0.3 mmol).  **$^1H$  NMR** (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.63 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.83 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 6.76 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.38 (dd,  $J$  = 16.8, 1.0 Hz, 1H), 6.29 (dd,  $J$  = 16.8, 10.2 Hz, 1H), 5.72 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.16 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.73 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 2H), 3.66 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 3.46 (s, 3H), 3.27 (s, 4H), 2.60 (s, 4H), 2.37 (s, 3H), 0.97 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), -0.01 (s, 9H).  **$^{13}C$  NMR** (151 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.17, 152.78, 150.70, 150.62, 145.71, 136.41, 132.33, 131.97, 129.10, 128.30, 126.66, 123.39, 120.91, 119.75, 116.07, 115.08, 113.76, 112.74, 104.52, 70.90, 69.38, 66.42, 59.05, 54.96, 53.56, 48.93, 48.20, 46.03, 17.98, -1.37. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[C_{36}H_{48}N_6O_5Si+H]^+$  673.35, gefunden 673.47.

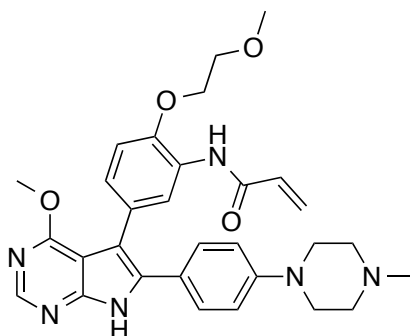




***N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-methoxypropoxy)phenyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus 5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-methoxypropoxy)anilin (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (48.0 mg, 0.3 mmol, 2.2 eq) in THF wurde bei 0 °C über 15 min tropfenweise eine Lösung aus Acryloylchlorid (15.5 µL, 0.2 mmol, 1.2 eq) in THF (1 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (12 h). Die Mischung wurde anschließend mit EtOAc und Wasser verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer HCl-Lösung (1 M), wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

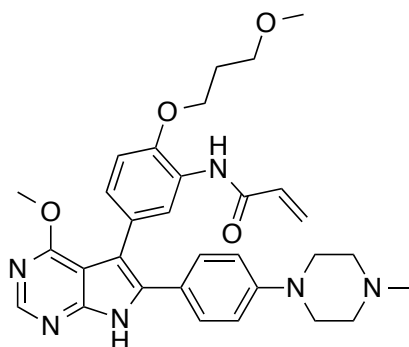
**Ausbeute:** 75% (81 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.63 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 16.9, 0.9 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 5.68 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 4.27 (dd, *J* = 10.6, 6.2 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.62 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.55 (dd, *J* = 10.2, 7.1 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 10.3, 3.1 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.26 (s, 4H), 2.60 (s, 4H), 2.36 (s, 3H), 1.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 0.93 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.26, 163.16, 152.86, 150.80, 150.62, 145.01, 136.47, 132.45, 132.01, 129.82, 129.27, 126.71, 126.38, 123.62, 121.15, 116.82, 115.23, 113.91, 104.58, 77.04, 76.04, 70.85, 66.50, 59.31, 54.97, 53.65, 48.22, 46.01, 18.06, 17.14, -1.31. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si+H]<sup>+</sup> 687.37, gefunden 687.41.



***N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid (33a)**

Zu einer Lösung aus *N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid (171.2 mg, 0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

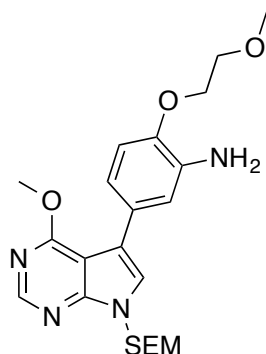
**Ausbeute:** 72% (99.0 mg, 0.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.05 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 16.9, 10.0 Hz, 1H), 5.66 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.69 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.21 (s, 4H), 2.55 (s, 4H), 2.32 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.40, 163.21, 152.23, 150.38, 149.88, 146.09, 133.94, 131.98, 129.51, 128.97, 128.50, 126.98, 126.69, 123.52, 122.96, 115.50, 113.08, 111.18, 106.22, 71.03, 69.51, 59.22, 54.96, 53.70, 48.17, 46.03. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 543.27143, gefunden 543.27285, calc. for [C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup> 565.25337, found 565.25505.



***N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-methoxypropoxy)phenyl)acrylamid (33b)**

Zu einer Lösung aus *N*-(5-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-methoxypropoxy)phenyl)acrylamide (81.0 mg, 0.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

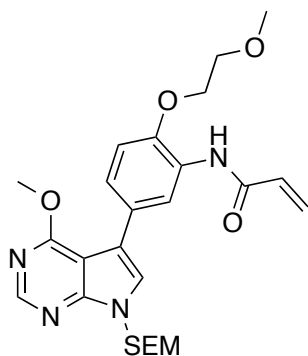
**Ausbeute:** 79% (52.1 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.28 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.61 (dd, *J* = 10.2, 7.2 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 10.2, 2.7 Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.29 (s, 4H), 2.63 (s, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.39 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.36, 163.26, 152.23, 150.40, 149.83, 145.28, 134.01, 131.92, 130.17, 129.92, 129.54, 126.91, 126.56, 123.64, 122.92, 117.27, 115.44, 111.17, 106.17, 76.03, 59.33, 54.96, 53.66, 48.18, 46.04, 17.13. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 557.28708, gefunden 557.28870, berechnet für [C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup> 579.26902, gefunden 579.27084.



**5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)anilin**

Eine Lösung aus Verbindung **35a** (125.0 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq), Eisenpulver (83.8 mg, 1.5 mmol, 5.0 eq) und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (160.5 mg, 3.0 mmol, 10.0 eq) in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1) wurde für 3 h auf 60 °C im Ultraschallbad erhitzt. Anschließend wurde die resultierende Lösung über Celite filtriert, mit MeOH gewaschen und der Durchfluss im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

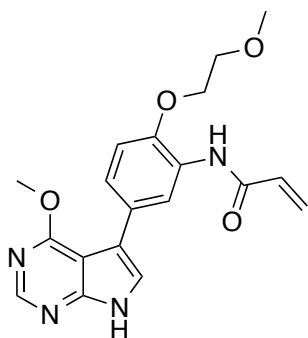
**Ausbeute:** 96% (112 mg, 0.2 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.47 (s, 1H), 7.21 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.10 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.39 (br s, 2H), 4.20 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.78 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.55 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 0.91 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.58, 152.99, 151.28, 146.63, 133.71, 127.69, 123.25, 121.05, 117.70, 117.66, 112.78, 103.48, 73.12, 71.22, 68.50, 66.56, 59.19, 53.56, 17.84, -1.33. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}+\text{H}]^+$  445.23, gefunden 445.14.



***N*-(5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus 5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)anilin (49.0 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30.4 mg, 0.2 mmol, 2.2 eq) in THF wurde bei 0 °C über 15 min tropfenweise eine Lösung aus Acryloylchlorid (9.8 µL, 0.1 mmol, 1.2 eq) in THF (1 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (12 h). Die Mischung wurde anschließend mit EtOAc und Wasser verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer HCl-Lösung (1 M), wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

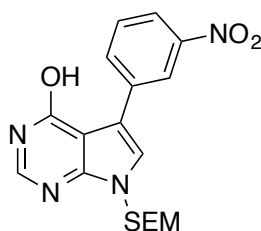
**Ausbeute:** 89% (49 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.91 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 6.36 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 5.81 (dd, 10.2, 1.0 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.28 (dd, *J* = 5.3, 3.7 Hz, 2H), 4.19 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 5.3, 3.7 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 0.98 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), -0.00 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.60, 163.46, 152.73, 150.97, 146.38, 131.86, 129.27, 128.37, 127.21, 124.42, 123.85, 120.62, 117.75, 114.22, 103.53, 73.27, 70.98, 70.07, 66.61, 59.18, 54.07, 17.84, -1.32. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si+H]<sup>+</sup> 499.24, gefunden 499.30.



***N*-(5-(4-methoxy-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid (33c)**

Zu einer Lösung aus *N*-(5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)acrylamid (40.0 mg, 0.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

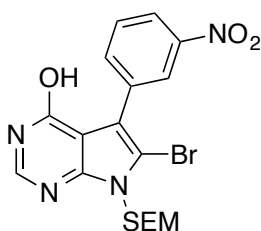
**Ausbeute:** 81% (24 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.26 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.75 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.47 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.97, 163.53, 151.88, 150.00, 146.34, 131.87, 129.23, 128.56, 127.29, 124.48, 121.26, 120.72, 117.49, 114.26, 103.58, 71.00, 70.07, 59.20, 54.13. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 369.15573, gefunden 369.15627, berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup> 391.13768, gefunden 391.13810.



### 5-(3-Nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (**36**)

Verbindung **23** (2.9 g, 7.1 mmol, 1.0 eq),  $K_2CO_3$  (2.0 g, 14.2 mmol, 2.0 eq) und *m*-Nitrophenylboronsäure (1.4 g, 8.5 mmol, 1.2 eq) wurden in MeCN:H<sub>2</sub>O (30:15 mL) gelöst und 15 min mit Argon entgast. Anschließend wurde  $Pd(PPh_3)_4$  (321.0 mg, 0.7 mmol, 0.1 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für 90 min in einem Mikrowellenreaktor auf 150 °C erhitzt. Die resultierende Reaktionslösung wurde über Celite abfiltriert und der Durchfluss mit EtOAc (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 69% (1.9 g, 4.9 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  12.54 (s, 1H), 9.03 (t,  $J = 1.53$  Hz, 1H), 8.21 (d,  $J = 7.65$  Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J = 8.03$  Hz,  $J = 1.53$  Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.57 (t,  $J = 7.65$  Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 3.61 (t,  $J = 8.41$  Hz, 2H), 0.97 (t,  $J = 8.41$  Hz, 2H), -0.01 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  158.5, 149.2, 144.7, 135.3, 133.8, 133.1, 132.0, 129.5, 123.4, 122.4, 120.7, 104.8, 73.0, 65.7, 17.1, -1.4 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[C_{18}H_{22}O_4N_4Si+H]^+$  387.14831, gefunden 387.14953.

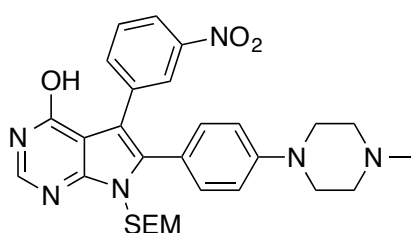


### 6-Brom-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (**37**)

Zu einer Lösung aus Verbindung **36** (1.2 g, 3.1 mmol, 1.0 eq) in MeCN (70 mL) wurde bei Raumtemperatur *N*-Bromsuccinimid (1.1 g, 6.1 mmol, 2.0 eq) zugegeben. Nach 90 min wurde die Reaktion mit Wasser (20 mL) gequentscht und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger  $Na_2S_2O_3$ -Lösung, 1 M NaOH-Lösung und gesättigter, NaCl-Lösung gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt als

brauner Feststoff erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

**Ausbeute:** quant. (1.5 g, 3.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.28 (s, 1H), 8.40–8.35 (m, 1H), 8.21 (ddd, *J* = 8.3, 2.3, 1.0 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 8.02–7.98 (m, 1H), 7.74 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 3.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.06 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 179.32, 156.94, 147.22, 145.29, 136.79, 133.48, 133.12, 131.98, 129.18, 124.78, 121.87, 117.13, 107.84, 105.68, 71.95, 65.84, 17.07, -1.42 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>BrSi+H]<sup>+</sup> 465.05882, gefunden 465.05882, berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub><sup>81</sup>BrSi+H]<sup>+</sup> 467.05677, gefunden 467.05671.

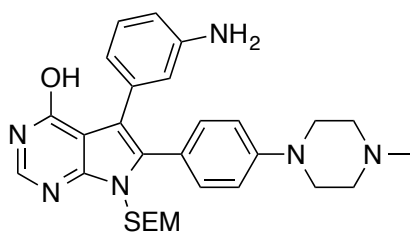


**6-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (38)**

Das Bromid **37** (3.3 g, 7.0 mmol, 1.0 eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.9 g, 14.0 mmol, 2.0 eq) und 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenylboronsäure Pinacolester (2.5 g, 8.4 mmol, 1.2 eq) wurden in DME:H<sub>2</sub>O (4:1, 60 mL) aufgenommen und die Suspension für 15 min mit Argon entgast. Danach wurde Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.8 g, 0.7 mmol, 0.1 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 90 min in einem Mikrowellenreaktor auf 150 °C erhitzt. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (20:1, 30 mL) aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit gesättigter, NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 56% (2.2 g, 3.9 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.13 (s, 1H), 8.23–8.11 (m, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.03–7.98 (m, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.38 (s, 2H), 3.48 (t, *J* = 8.03, 2H), 3.20–3.16 (m, 4H), 2.45–2.40 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 0.79 (t, *J* = 8.03 Hz, 2H), -0.09 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 157.90, 150.68, 148.42, 147.04, 144.37, 136.91, 135.25, 134.22, 131.79, 128.60, 125.24, 120.62, 118.44, 114.71, 114.49, 105.13, 70.53, 65.70, 54.41, 47.13, 45.69, 24.91, 24.64, 17.28, -1.46 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub>Si+H]<sup>+</sup> 561.26401, gefunden 561.26498.

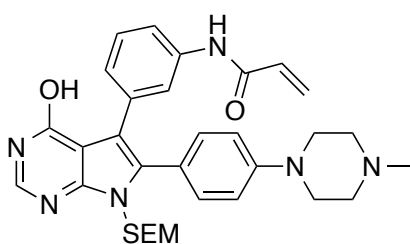




**5-(3-Aminophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (39)**

Die Nitroverbindung **38** (1.3 g, 2.3 mmol, 1.0 eq),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.1 g, 20.9 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (388 mg, 7.0 mmol, 3.0 eq) wurden vorgelegt, anschließend wurde  $\text{EtOH:H}_2\text{O}$  (4:1, 21 mL) hinzugegeben und die Suspension für 3 h auf 80 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und der Durchfluss im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) aufgenommen und die entstehenden Phasen getrennt. Die organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 94% (1.2 g, 2.2 mmol)  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.91 (bs, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.80$  Hz, 2H), 6.87 (d,  $J = 8.80$  Hz, 2H), 6.80 (t,  $J = 7.65$  Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.36 (dd,  $J = 8.03$ ,  $J = 1.15$  Hz, 1H), 6.30 (d,  $J = 7.65$  Hz, 1H), 5.75 (s, 2H), 4.81 (bs, 2H), 3.43–3.51 (t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), 3.20–3.11 (t,  $J = 4.97$ , 4 H), 2.46–2.39 (t,  $J = 4.97$  Hz, 4H), 2.21 (s, 3H), 0.82–0.74 (t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), -0.08 ppm (s, 9H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  531.28983, gefunden 531.29024, berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{N}_6\text{Si}+\text{Na}]^+$  553.27177, gefunden 553.27080.

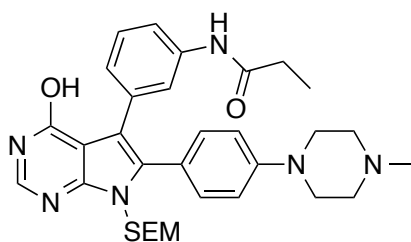


**N-(3-(4-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (40a)**

Zu einer Lösung aus dem Amin **39** (1.2 g, 2.3 mmol, 1.0 eq) in trockenem THF (28 mL) wurde DIPEA (4.0 mL, 23.2 mmol, 10.0 eq) zugegeben. Bei 0 °C wurde anschließend eine Lösung aus Acryloylchlorid (374.7  $\mu\text{L}$ , 4.6 mmol, 2.0 eq) in THF (2 mL) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Wasser (15 mL) hinzugegeben, die Phasen

getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (20:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als blassgelben Feststoff.

**Ausbeute:** 76% (1.0 g, 1.8 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.98 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 7.98 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.10 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.43 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.7$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.48 (t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), 3.16 (s, 4H), 2.43 (s, 4H), 2.21 (s, 3H), 0.79 (t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), -0.08 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.92, 157.75, 150.24, 148.04, 143.93, 138.10, 134.20, 133.07, 131.97, 131.66, 130.40, 127.40, 126.52, 125.88, 122.12, 119.37, 116.90, 114.24, 105.58, 70.51, 65.59, 54.47, 47.12, 45.66, 17.30, -1.44 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  585.30039, gefunden 585.29912.

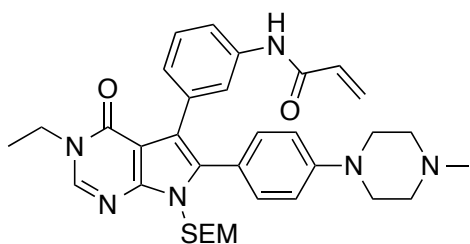


***N*-(3-(4-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)propionamid (40b)**

Zu einer Lösung aus dem Amin **39** (200.0 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq) in trockenem THF (9 mL) wurde DIPEA (0.6 mL, 3.8 mmol, 10 eq) zugegeben. Bei 0 °C wurde anschließend eine Lösung aus Propionylchlorid (39  $\mu\text{L}$ , 0.5 mmol, 1.2 eq) in THF (1 mL) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Wasser (5 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (20:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 82% (183.0 mg, 0.3 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.97 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.55 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.14 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.06 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.75 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.48 (t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), 3.16 (t,  $J = 4.59$  Hz, 4H), 2.42 (t,  $J = 4.59$  Hz, 4H), 2.28 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.05 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H), 0.79

(t,  $J = 8.03$  Hz, 2H), -0.08 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.71, 157.73, 150.22, 148.00, 143.89, 138.47, 134.10, 132.99, 131.65, 127.25, 121.79, 119.45, 117.05, 116.85, 114.75, 114.22, 105.63, 70.51, 65.58, 54.49, 47.14, 45.67, 29.44, 17.30, 9.65, -1.44 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  587.31604, gefunden 587.31752, berechnet für  $[\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{N}_6\text{Si}+\text{Na}]^+$  609.29799, gefunden 609.29827.



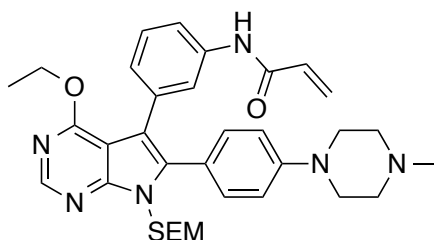
***N*-(3-(3-ethyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (41a)**

Zu einer Lösung aus Verbindung **40a** (100.0 mg, 171.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) in trockenem THF (3 mL) wurde  $\text{PPh}_3$  (448.5 mg, 1.7 mmol, 10.0 eq) und EtOH (120.0  $\mu\text{L}$ , 1.7 mmol, 12.0 eq) zugegeben und die resultierende Lösung für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde DIAD (335.7  $\mu\text{L}$ , 1.7 mmol, 10.0 eq) hinzugefügt und die Reaktion bis zum vollständigem Umsatz im Ultraschallbad auf 40 °C erhitzt. Anschließend wurde Wasser (2 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (95:5) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung, gefolgt von Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung mittels C18 Säule wurde das Produkt als blassgelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute**: 44% (47.1 mg, 76.9  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.06 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.64 (dd,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.11 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.79 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.9$  Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.99 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.50–3.46 (m, 2H), 3.17 (s, 4H), 2.47 (s, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 0.81–0.77 (m, 2H), -0.08 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.00, 156.76, 150.23, 147.51, 146.48, 138.16, 134.23, 133.56, 132.01, 131.71, 127.50, 126.69, 126.12, 122.16, 117.27, 116.84, 114.35, 104.92, 70.46, 65.69, 54.95, 54.38, 47.00, 45.51, 40.70, 17.31, 15.22, -1.38 ppm. **LC/MS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  613.33, gefunden 613.64.

**Tabelle E1.** Kristall-Daten und Struktur-Refinement für Verbindung **41a**.

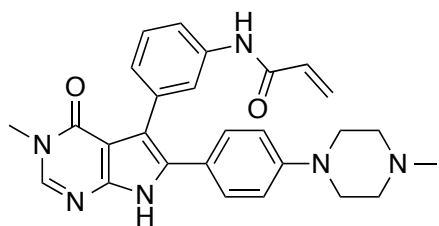
Empirische Formel	C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> Si
Molekulargewicht	612.84
Temperatur [K]	100.03
Kristallsystem	triclinic
Raumgruppe	P-1
a [Å]	10.380(2)
b [Å]	12.351(3)
c [Å]	13.352(3)
α [°]	98.84(3)
β [°]	91.06(3)
γ [°]	106.73(3)
Volumen [Å <sup>3</sup> ]	1616.3(6)
Z	2
ρ <sub>calc</sub> [g/cm <sup>3</sup> ]	1.259
μ [mm <sup>-1</sup> ]	0.117
F(000)	656.0
Kristallgröße [mm <sup>3</sup> ]	0.219 × 0.176 × 0.050
Bestrahlung	MoKα (λ = 0.71073)
2θ-Bereich für Daten-Aufnahme [°]	5.036 bis 57.668
Index-Bereich	-14 ≤ h ≤ 14, -16 ≤ k ≤ 16, -18 ≤ l ≤ 18
Aufgenommene Reflexe	71228
Unabhängige Reflexe	8384 [R <sub>int</sub> = 0.0863, R <sub>sigma</sub> = 0.0587]
Daten/Einschränkungen/Parameter	8384/0/460
Goodness-of-fit auf F <sup>2</sup>	1.028
Finale R Indizes (I ≥ 2σ (I))	R <sub>1</sub> = 0.0636, wR <sub>2</sub> = 0.1444
Finale R Indizes (all data)	R <sub>1</sub> = 0.1070, wR <sub>2</sub> = 0.1678
Größte Differenz peak/hole / e [Å <sup>-3</sup> ]	0.95/-0.55



***N*-(3-(4-ethoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (41b)**

Zu einer Lösung aus Verbindung **40a** (100.0 mg, 171.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) in trockenem THF (3 mL) wurde  $\text{PPh}_3$  (448.5 mg, 1.7 mmol, 10.0 eq) und EtOH (120.0  $\mu\text{L}$ , 1.7 mmol, 12.0 eq) zugegeben und die resultierende Lösung für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde DIAD (335.7  $\mu\text{L}$ , 1.7 mmol, 10.0 eq) hinzugefügt und die Reaktion bis zum vollständigem Umsatz im Ultraschallbad auf 40 °C erhitzt. Anschließend wurde Wasser (2 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$  (95:5) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung, gefolgt von Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung mittels C18 Säule wurde das Produkt als blassgelber Feststoff erhalten.

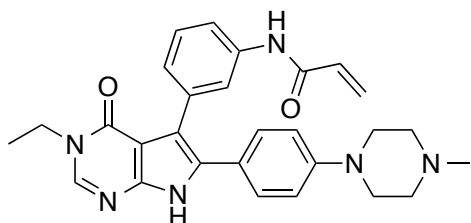
**Ausbeute:** 42% (44.1 mg, 72.0  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10.06 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.14 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.43 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 4.40 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.50 (t,  $J = 8.1$  Hz, 3H), 3.21 (s, 4H), 2.28 (s, 3H), 1.23 (s, 4H), 1.19 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 0.82–0.78 (m, 2H), -0.10 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  163.04, 161.98, 152.41, 150.75, 150.38, 138.30, 136.20, 134.20, 131.97, 131.77, 127.59, 126.73, 126.02, 122.16, 119.18, 117.20, 114.36, 113.07, 103.42, 70.50, 69.81, 65.85, 61.80, 54.27, 46.82, 17.31, 13.97, -1.40 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{N}_6\text{Si}+\text{H}]^+$  613.33, gefunden 613.44.



***N*-(3-(3-methyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42a)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Methanol als Substrat.

**Ausbeute:** 35% (8.0 mg, 17.1  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.11 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.21 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.14 (s, 4H), 2.45 (s, 4H), 2.23 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  148.06, 146.82, 138.88, 135.68, 132.44, 130.75, 128.97, 128.28, 122.30, 117.80, 115.04, 114.83, 106.42, 66.70, 54.85, 47.70, 40.00, 33.55, 26.46, 21.98 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  469.23465, gefunden 469.23495, berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  491.21660, gefunden 491.21651.

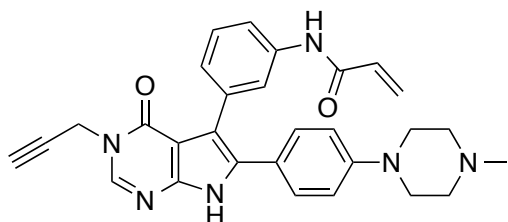


***N*-(3-(3-ethyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42b)**

Verbindung **41a** (20.0 mg, 32.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur mit TFA (2 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sowie TFA im Luftstrom entfernt und der Überstand in THF (30 mM) aufgenommen, mit wässriger NaOH-Lösung (1 M, 2 mL) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (95:5) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 75% (11.8 mg, 24.5  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.28 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.29–7.24

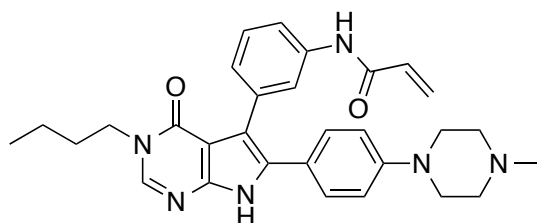
(m, 3H), 6.99 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.45 (dd,  $J = 16.8$ , 10.3 Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.94 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.16 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H), 2.42 (bs, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.21 ppm (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{28}H_{30}O_2N_6+H]^+$  483.25030, gefunden 483.24924.



***N*-(3-(6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42c)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Propargylalkohol als Substrat.

**Ausbeute**: 79% (33.3 mg, 67.6  $\mu$ mol) über 2 Schritte.  **$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.25 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.45 (dd,  $J = 16.9$ , 10.2 Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 16.9$ , 1.8 Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2$ , 1.6 Hz, 1H), 4.74 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H), 3.34 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 3.14 (s, 4H), 2.43 (s, 4H), 2.22 ppm (s, 3H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{29}H_{28}O_2N_6+H]^+$  493.23465, gefunden 493.23496, berechnet für  $[C_{29}H_{28}O_2N_6+Na]^+$  515.21660, gefunden 515.21650.

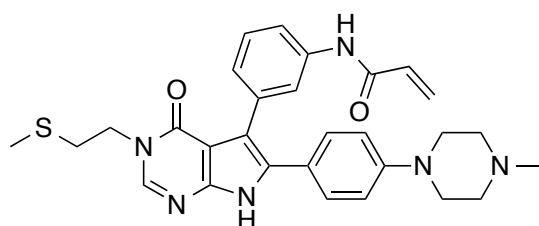


***N*-(3-(3-butyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42d)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 1-Butanol als Substrat.

**Ausbeute**: 42% (19.5 mg, 38.2  $\mu$ mol) über 2 Schritte.  **$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.12 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83

(d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 3.90 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.14 (s, 4H), 2.44 (s, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.65–1.55 (m, 2H), 1.28 (dd,  $J = 15.0, 7.4$  Hz, 2H), 0.89 ppm (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.98, 157.01, 149.75, 147.38, 146.06, 138.39, 135.20, 131.97, 130.34, 128.50, 127.80, 126.58, 126.24, 121.81, 121.36, 117.33, 114.56, 114.50, 106.07, 54.38, 47.23, 45.53, 45.01, 31.30, 19.28, 13.54 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  511.28160, gefunden 511.28168, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  533.26355, gefunden 533.26324.

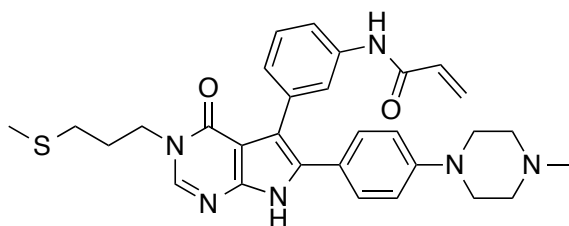


***N*-(3-(6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-3-(2-(methylthio)ethyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42e)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 2-(Methylthio)ethanol als Substrat.

**Ausbeute:** 14% (4.7 mg, 8.9  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.17 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.7$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 4.09 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.17 (s, 4H), 2.77 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.09 ppm (s, 3H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}+\text{H}]^+$  529.23802, gefunden 529.23941, berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}+\text{Na}]^+$  551.21997, gefunden 551.22131.

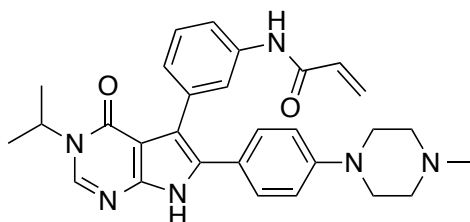




***N*-(3-(6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-3-(3-(methylthio)propyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42f)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 3-(methylthio)propan-1-ol als Substrat.

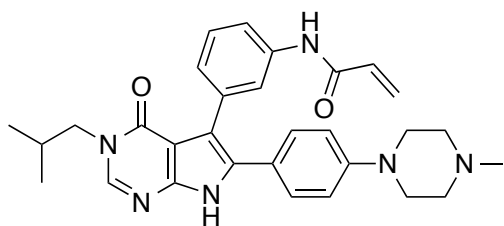
**Ausbeute:** 4% (2.6 mg, 4.8  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.19 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.73 (dd,  $J = 10.2, 1.6$  Hz, 1H), 3.97 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.16 (s, 4H), 2.48–2.44 (m, 2H), 2.28 (s, 4H), 2.04 (s, 3H), 1.93–1.85 (m, 2H), 0.85 ppm (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}+\text{H}]^+$  543.25367, gefunden 543.25320, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}+\text{Na}]^+$  565.23562, gefunden 565.23510.



***N*-(3-(3-isopropyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42g)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 2-Propanol als Substrat.

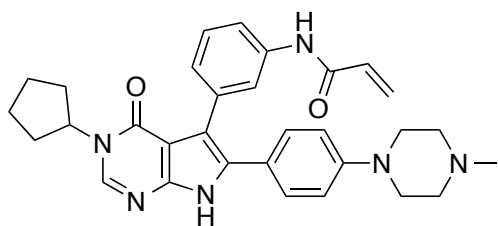
**Ausbeute:** 16% (5.6 mg, 11.3  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.13 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.74 (dd,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.21 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 5.04–4.96 (m, 1H), 3.51 (s, 1H), 3.17 (s, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.36 ppm (s, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  497.26595, gefunden 497.26676.



***N*-(3-(3-isobutyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42h)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 2-Methyl-1-propanol als Substrat.

**Ausbeute:** 25% (12.7 mg, 24.8  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.13 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.21 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.7$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.5$  Hz, 1H), 3.72 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.15 (s, 4H), 2.47 (s, 4H), 2.24 (s, 3H), 2.08–1.98 (m, 1H), 0.86 (s, 3H), 0.84 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  162.98, 157.19, 149.71, 147.34, 146.38, 138.38, 135.17, 131.97, 130.34, 128.52, 127.79, 126.58, 126.24, 121.83, 121.52, 121.39, 117.33, 114.57, 105.99, 54.31, 52.24, 47.16, 45.42, 27.50, 19.51 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  511.28160, gefunden 511.28278, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  533.26355, gefunden 533.26445.

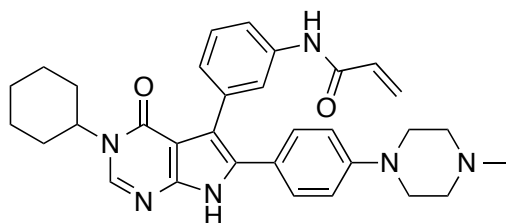


***N*-(3-(3-cyclopentyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42i)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Cyclopentanol als Substrat.

**Ausbeute:** 27% (9.2 mg, 17.6  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.13 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.21 (dd,  $J = 17.4, 9.4$  Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.93 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.02 (p,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 3.18 (s, 4H), 2.58 (s, 3H), 2.33 (s, 4H), 2.00 (dd,  $J = 16.4, 8.0$  Hz, 2H), 1.88–1.76 (m, 4H), 1.67–1.58 ppm

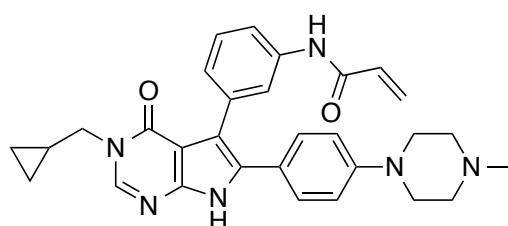
(m, 2H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{31}H_{34}O_2N_6+H]^+$  523.28160, gefunden 523.28288, berechnet für  $[C_{31}H_{34}O_2N_6+Na]^+$  545.26355, gefunden 545.26461.



***N*-(3-(3-cyclohexyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42j)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Cyclohexanol als Substrat.

**Ausbeute**: 63% (29.1 mg, 54.2  $\mu$ mol) über 2 Schritte.  **$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.25 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.65 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.26 (dd,  $J$  = 15.4, 8.3 Hz, 3H), 6.98 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.43 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J$  = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J$  = 10.2, 1.8 Hz, 1H), 5.23 (dd,  $J$  = 6.8, 3.4 Hz, 1H), 3.17 (s, 4H), 2.48 (s, 4H), 2.25 (s, 3H), 1.70 (s, 2H), 1.46–1.35 (m, 4H), 1.26–1.19 ppm (m, 4H).  **$^{13}C$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.97, 161.39, 152.27, 150.18, 150.01, 138.54, 135.46, 132.74, 131.94, 128.78, 127.89, 126.05, 121.94, 121.06, 118.50, 117.27, 114.52, 112.43, 110.33, 105.29, 102.31, 71.85, 54.25, 47.05, 30.49, 25.06, 22.01 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{32}H_{36}O_2N_6+H]^+$  537.29725, gefunden 537.29802.

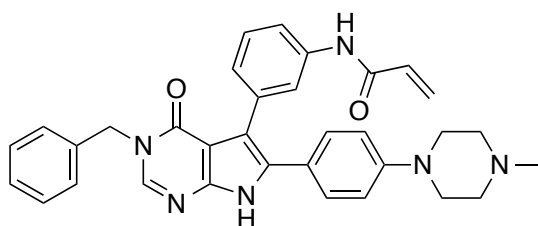


***N*-(3-(3-(cyclopropylmethyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42k)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Cyclopropylmethanol als Substrat.

**Ausbeute**: 34% (11.8 mg, 23.3  $\mu$ mol) über 2 Schritte.  **$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.13 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.73 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.22 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J$  = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J$  = 17.0, 1.8 Hz,

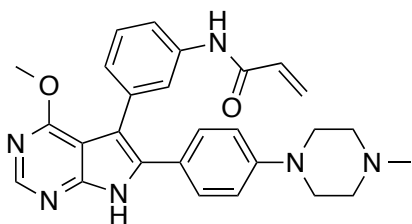
1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 3.76 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.13 (t,  $J = 1.0$  Hz, 3H), 2.41 (t,  $J = 1.0$  Hz, 4H), 2.20 (s, 3H), 1.26–1.19 (m, 1H), 0.45 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 0.37 ppm (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.97, 157.14, 152.03, 151.54, 151.17, 149.81, 147.40, 145.97, 138.38, 135.22, 131.95, 130.38, 128.49, 127.81, 126.58, 126.23, 121.80, 121.30, 117.34, 114.52, 106.08, 54.47, 49.29, 47.34, 45.69, 11.22, 3.42 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  509.26595, gefunden 509.26544, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  531.24790, gefunden 531.24714.



***N*-(3-(3-benzyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (42l)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Benzylalkohol als Substrat.

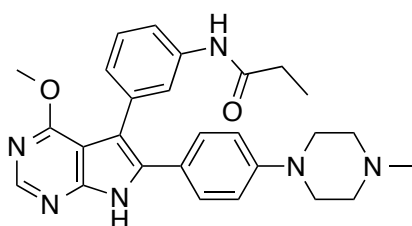
**Ausbeute:** 62% (23.1 mg, 41.7  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.21 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.35–7.23 (m, 5H), 7.21 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.43 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.14 (s, 4H), 2.43 (s, 4H), 2.21 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.97, 156.96, 149.80, 147.31, 146.18, 138.40, 137.71, 135.08, 131.95, 130.57, 128.51, 128.48, 127.83, 127.37, 127.33, 126.57, 126.21, 121.73, 121.23, 117.37, 114.62, 114.54, 106.15, 54.39, 47.96, 47.24, 45.57, 39.52 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  545.26595, gefunden 545.26681, berechnet für  $[\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  567.24790, gefunden 567.24809.



***N*-(3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31a)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Methanol als Substrat.

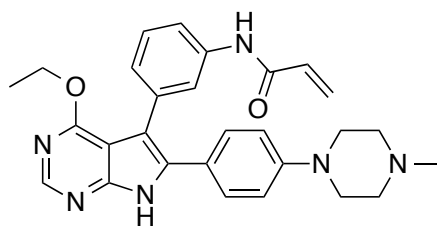
**Ausbeute:** 31% (4.0 mg, 8.5  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.11 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.21 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 16.9, 10.1$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.15 (s, 4H), 2.46 (s, 4H), 2.24 ppm (s, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  469.23465, gefunden 469.23490, berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  491.21660, gefunden 491.21668.



***N*-(3-(3-methyl-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)propionamid (19b)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40b** und mit Methanol als Substrat.

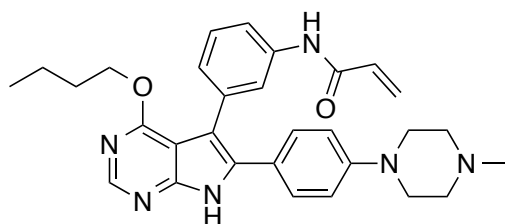
**Ausbeute:** 69% (22.2 mg, 47.2  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.09 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.17 (t,  $J = 7.8$  Hz, 3H), 6.88 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 (s, 4H), 2.29 (s, 4H), 1.06 ppm (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  171.78, 157.53, 149.56, 147.52, 146.32, 138.78, 135.13, 130.13, 128.42, 127.67, 125.52, 121.57, 121.48, 117.03, 114.62, 114.56, 106.01, 54.16, 47.02, 33.04, 29.45, 9.64 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  471.25030, gefunden 471.25032.



***N*-(3-(4-ethoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31c)**

Verbindung **41b** (20.0 mg, 32.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur mit TFA (2 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sowie TFA im Luftstrom entfernt und der Überstand in THF (30 mM) aufgenommen, mit wässriger NaOH-Lösung (1 M, 2 mL) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$  (95:5) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 75% (9.1 mg, 18.9  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.12 (s, 1H), 10.07 (bs, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.69 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.95 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.42 (dd,  $J = 16.8, 10.3$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 4.35 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.13 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H), 2.42 (bs, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.16 ppm (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  483.25030, gefunden 483.24926.

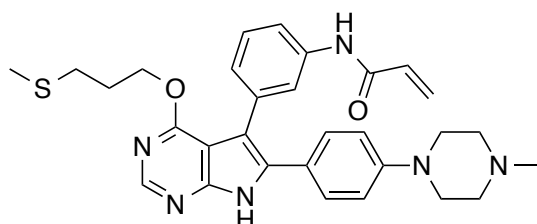


***N*-(3-(4-butoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31d)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 1-Butanol als Substrat.

**Ausbeute:** 39% (16.8 mg, 32.9  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.28 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.24 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.27 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.19 (s, 4H), 2.52 (s,

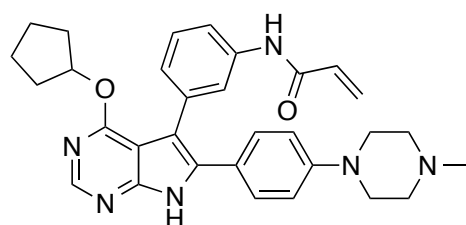
4H), 2.27 (s, 3H), 1.49 (dq,  $J = 12.4, 6.2$  Hz, 2H), 1.14 (dd,  $J = 16.1, 8.5$  Hz, 2H), 0.75 ppm (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.98, 161.95, 152.13, 150.18, 149.98, 138.62, 135.40, 132.83, 131.96, 128.82, 127.90, 126.56, 126.02, 121.77, 121.04, 117.22, 114.54, 110.25, 104.94, 65.09, 54.18, 46.94, 45.25, 30.33, 18.59, 13.54 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  511.28160, gefunden 511.28136, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  533.26355, gefunden 533.26286.



***N*-(3-(6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(3-(methylthio)propoxy)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31e)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 3-(methylthio)propan-1-ol als Substrat.

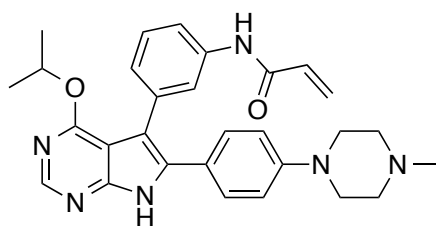
**Ausbeute**: 13% (7.1 mg, 13.1  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.34 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.29–7.24 (m, 3H), 6.98 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.42 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.34 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.17 (s, 4H), 2.44 (s, 4H), 2.26–2.21 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.77 ppm (dt,  $J = 12.6, 6.3$  Hz, 2H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}+\text{H}]^+$  543.25367, gefunden 543.25335.



***N*-(3-(4-(cyclopentyloxy)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31f)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit Cyclopentanol als Substrat.

**Ausbeute:** 23% (7.6 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.24 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.66 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.24 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.43 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 5.54–5.50 (m, 1H), 3.17 (s, 4H), 2.49–2.43 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.78–1.70 (m, 2H), 1.60–1.52 (m, 2H), 1.44–1.38 ppm (m, 4H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  523.28160, gefunden 523.28244, berechnet für  $[\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  545.26355, gefunden 545.26432.

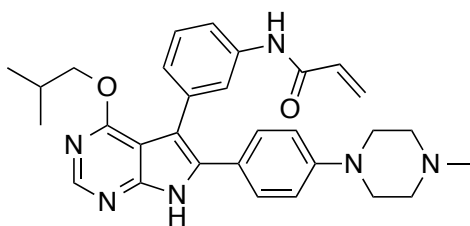


***N*-(3-(4-isopropoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31g)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 2-Propanol als Substrat.

**Ausbeute:** 43% (14.5 mg, 29.2  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.24 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.65 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.24 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.33 (spt,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 3.18 (s, 4H), 2.49–2.46 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.16 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  163.00, 161.47, 152.32, 150.18, 150.05, 138.37, 135.14, 132.85, 131.95, 128.93, 127.71, 126.58, 126.25, 122.04, 121.05, 117.22, 114.53, 110.28, 105.04, 68.18, 54.26, 47.04, 45.39, 21.58 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  497.26595, gefunden 497.26679.

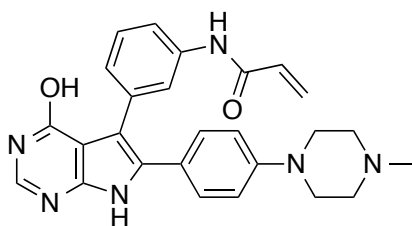




***N*-(3-(4-isobutoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31h)**

Wurde entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift: Mitsunobu-Derivatisierung synthetisiert, ausgehend von Verbindung **40a** und mit 2-Methyl-1-propanol als Substrat.

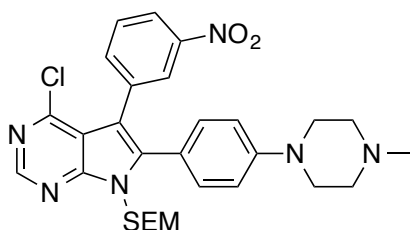
**Ausbeute:** 39% (17.3 mg, 33.9  $\mu\text{mol}$ ) über 2 Schritte.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.28 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.27 (dd,  $J = 12.5, 6.2$  Hz, 3H), 7.00 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.42 (dd,  $J = 17.0, 10.1$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 4.07 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.17 (s, 4H), 2.46 (s, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.79 (dp,  $J = 13.0, 6.5$  Hz, 1H), 0.72 (s, 3H), 0.71 ppm (s, 3H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  163.00, 152.10, 150.14, 150.03, 138.64, 135.60, 132.80, 131.93, 128.72, 128.05, 126.58, 126.09, 121.71, 120.97, 117.41, 117.38, 114.51, 110.23, 105.07, 71.55, 54.28, 47.05, 45.44, 27.33, 18.70 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  511.28160, gefunden 511.28213, berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  533.26355, gefunden 533.26369.



***N*-(3-(4-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (31i)**

Verbindung **40a** (30.2 mg, 51.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur mit TFA (2 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sowie TFA im Luftstrom entfernt und der Überstand in THF (30 mM) aufgenommen, mit wässriger NaOH-Lösung (1 M, 2 mL) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (95:5) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

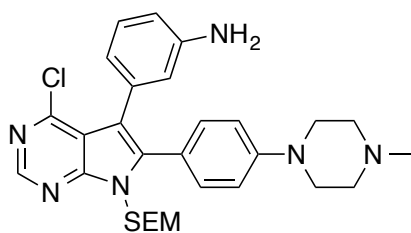
**Ausbeute:** 38% (8.9 mg, 19.6  $\mu$ mol) über 2 Schritte.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.92 (s, 1H), 7.73 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 6.98 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.44 (dd,  $J$  = 17.0, 10.0 Hz, 1H), 6.35 (dd,  $J$  = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J$  = 10.1, 1.5 Hz, 1H), 3.42 (s, 4H), 2.96 (s, 3H), 1.32 ppm (s, 4H).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.18 (s, 1H), 11.77 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.93 (dd,  $J$  = 19.4, 8.2 Hz, 3H), 6.47 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.22 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.72 (d,  $J$  = 11.7 Hz, 1H), 3.17 (s, 4H), 3.09 (s, 4H), 2.77 ppm (s, 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_6+\text{H}]^+$  455.21900, gefunden 455.21852, berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_6+\text{Na}]^+$  477.20095, gefunden 477.20035.



**4-Chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (44)**

Verbindung **38** (357 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq) wurde in MeCN (25 mL) gelöst und mit Benzyltriethylammoniumchlorid (290 mg, 1.27 mmol, 2.0 eq), *N,N*-Dimethylanilin (161 mL, 1.27 mmol, 2.0 eq) und Phosphorylchlorid (1.19 mL, 12.7 mmol, 20.0 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wird diese mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (100 mL) gequentscht und mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde durch Flashsäulenchromatographische Aufreinigung als gelber Feststoff gewonnen.

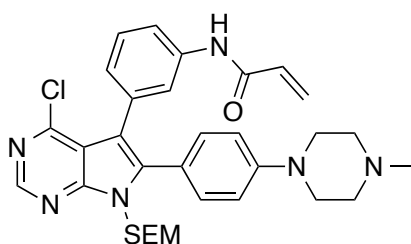
**Ausbeute:** 92% (340 mg, 0.59 mmol).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.75 (s, 1H), 8.15–8.18 (m, 2H), 7.70–7.72 (m, 1H), 7.59–7.63 (m, 1H), 7.23–7.26 (m,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.91–6.94 (m,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 5.56 (s, 2H), 3.52 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 3.16–3.20 (m, 4H), 2.41 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4H), 2.20 (s, 3H), 0.81 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), -0.10– -0.08 ppm (m, 9H). **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{ClN}_6\text{O}_3\text{Si}+\text{H}]^+$  579.23, gefunden 579.59.



**3-(4-Chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)-methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin**

Verbindung **52** (616 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 30 mL) gelöst und mit Ammoniumchlorid versetzt (569 mg, 10.6 mmol, 10.0 eq). Vor der Zugabe des Eisenpulvers (297 mg, 5.32 mmol, 5.0 eq) wurde der Kolben mit Argon geflutet. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 2 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Zur Aufreinigung wurde die Suspension über Celite filtriert und mit EtOAc gespült. Das organische Lösungsmittel wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 99% (580 mg, 1.06 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.67 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H), 6.47 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 3.52 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.14–3.22 (m, 4H), 2.38–2.45 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 0.79 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.14– -0.07 ppm (m, 9H). **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>6</sub>OSi+H]<sup>+</sup> 549.26, gefunden 549.20.

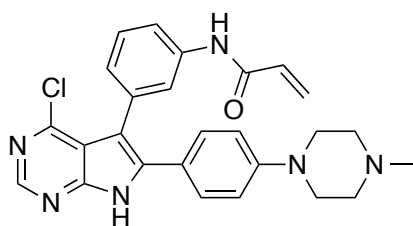


**N-(3-(4-chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (45)**

3-(4-Chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)-methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (412 mg, 0.75 mmol, 1.0 eq) wurde in THF (12 mL) gelöst und mit DIPEA (1.3 mL, 7.50 mmol, 10.0 eq) versetzt. Anschließend wurde bei 0 °C das in THF (1 mL) gelöste Acryloylchlorid (91.42 mL, 1.13 mmol, 1.5 eq) hinzugeotropft und für 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Durch Flash-säulenchromatographische Aufreinigung wurde das Produkt als gelber Feststoff gewonnen.

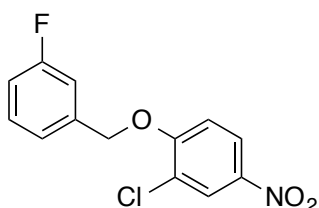
**Ausbeute:** 95% (432 mg, 0.72 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 10.14 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.20–7.30 (m, 3H), 6.87–6.97 (m, 3H), 6.41 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.22 (dd, *J* = 16.9, 2.0 Hz, 1H), 5.68–5.77 (m, 1H), 5.55 (s, 2H), 3.52 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.14–3.22 (m, 4H), 2.39–2.42 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 0.79 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.10 ppm (s, 9H). **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Si+H]<sup>+</sup> 603.27, gefunden 603.13.



***N*-(3-(4-chloro-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus Verbindung **53** (181 mg, 0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Wasser und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

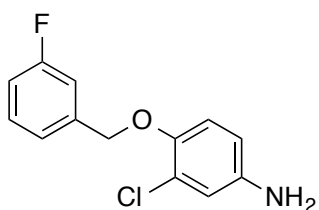
**Ausbeute:** 71% (101 mg, 0.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 12.86 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.76–7.81 (m, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27–7.32 (m, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.85–6.89 (m, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.42 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 16.9, 2.0 Hz, 1H), 5.72–5.76 (m, 1H), 3.13–3.21 (m, 4H), 2.35–2.42 (m, 4H), 2.19 ppm (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 151 MHz) δ 163.66, 152.35, 151.14, 150.30, 149.60, 139.28, 137.66, 134.76, 132.33, 129.55, 129.03, 127.41, 127.35, 122.57, 120.12, 118.79, 116.84, 114.80, 110.18, 54.83, 47.38, 46.11 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O+H]<sup>+</sup> 473.18511, gefunden 473.18543, berechnet für [C<sub>26</sub>H<sub>25</sub><sup>37</sup>ClN<sub>6</sub>O+H]<sup>+</sup> 475.18216, gefunden 475.18287.



### 2-Chlor-1-((3-fluorobenzyl)oxy)-4-nitrobenzol

2-Chlor-4-nitrophenol (4 g, 23.1 mmol, 1.0 eq) und  $K_2CO_3$  (9.6 g, 69.2 mmol, 3.0 eq) wurden in DMF (120 mL) gelöst und die Suspension auf 75 °C erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung aus 3-Fluorobenzylchlorid (5 g, 34.6 mmol, 1.5 eq) in DMF (80 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 75 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und in Eiswasser (200 mL) gegeben. Der Niederschlag wurde filtriert und das Filtrat mit MeCN:H<sub>2</sub>O (1:1) und *n*-Hexan gewaschen. Das Produkt wurde am Hochvakuum getrocknet und als weißer Feststoff erhalten.

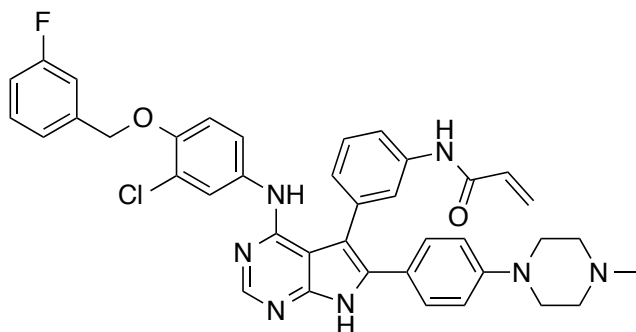
**Ausbeute:** 39% (2.54 g, 9.0 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.30–8.32 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 7.42–7.52 (m, 2H), 7.29–7.35 (m, 2H), 7.20 (td, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 5.40 ppm (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 126 MHz) δ 163.1, 161.2, 158.6, 140.9, 138.4, 130.7, 130.6, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 113.8, 70.1 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>ClFNO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 282.03, gefunden n.b. (nicht ionisierbar).



### 3-Chlor-4-((3-fluorobenzyl)oxy)anilin

2-Chlor-1-((3-fluorobenzyl)oxy)-4-nitrobenzol (2.5 g, 8.9 mmol, 1.0 eq), NH<sub>4</sub>Cl (4.3 g, 79.9 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (1.5 g, 26.6 mmol, 3.0 eq) wurden vorgelegt und in EtOH:H<sub>2</sub>O (4:1, 47 mL) aufgenommen. Die Suspension wurde bis zum vollständigen Umsatz auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Celite gefiltert und der Durchfluss im Vakuum eingeeengt, der Rückstand mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde das Produkt als beiger Feststoff erhalten und konnte ohne weitere Ausreinigung eingesetzt werden.

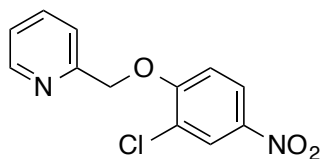
**Ausbeute:** 96% (2.1 g, 8.5 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 7.40–7.45 (m, 1H), 7.22–7.29 (m, 2H), 7.14 (td, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.94 ppm (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 126 MHz) δ 163.1, 161.1, 144.1, 140.3, 140.2, 130.3, 130.3, 123.2, 122.5, 116.9, 114.9, 113.2, 70.3 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>ClFNO+H]<sup>+</sup> 252.05860, gefunden 252.05921.



***N*-(3-(4-((3-chloro-4-((3-fluorobenzyl)oxy)phenyl)amino)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (46a)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlorpyrrolopyrimidin **53** (50 mg, 83 μmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 3-Chlor-4-((3-fluorobenzyl)oxy)anilin (31 mg, 124 μmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als leicht gelblicher Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 30% (17 mg, 25 μmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 12.30 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.75–7.88 (m, 3H), 7.50 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.23–7.32 (m, 4H), 7.09–7.20 (m, 3H), 7.02 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.43 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.1, 1.8 Hz, 1H), 5.73–5.80 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.20 (br. s., 4H), 2.56 (br. s., 4H), 2.31 (br. s., 3H), 1.22 ppm (br. s., 2H). **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>39</sub>H<sub>35</sub>ClFN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 688.26030, gefunden 688.25937.

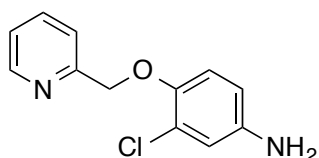


**2-((2-Chlor-4-nitrophenoxy)methyl)pyridin**

2-(Chlormethyl)pyridin (5.0 g, 30.5 mmol, 1.10 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.6 g, 55.4 mmol, 2.00 eq) wurden in DMF (40 mL) gelöst und die Suspension für 30 min bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 2-Chlor-4-nitrophenol (4.8 g, 27.7 mmol, 1.00 eq) und KI (232 mg, 1.4 mmol, 0.05 eq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 60 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und in Eiswasser (120 mL) gegeben. Der Niederschlag wurde filtriert und das Filtrat mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung des Filtrats am Hochvakuum wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten und konnte ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt werden.

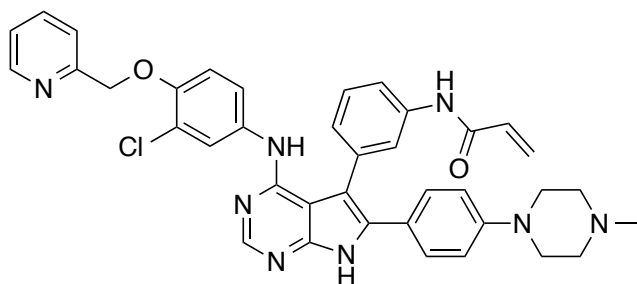
**Ausbeute:** 97% (7.1 g, 26.8 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.60 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 7.89 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 6.9, 5.4 Hz, 1H), 5.46 ppm (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 126 MHz) δ 158.7, 155.1, 149.2, 140.9, 137.2, 125.4, 124.5, 123.3, 121.9, 121.6, 113.9, 71.7 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 265.03745, gefunden 265.03645.



### 3-Chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin

2-((2-Chlor-4-nitrophenoxy)methyl)pyridin (7.0 g, 26.4 mmol, 1.0 eq), NH<sub>4</sub>Cl (12.7 g, 238 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (4.4 g, 79.3 mmol, 3.0 eq) wurden vorgelegt und in EtOH:H<sub>2</sub>O (4:1, 135 mL) aufgenommen. Die Suspension wurde bis zum vollständigen Umsatz auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und der Durchfluss im Vakuum eingeeengt, der Überstand mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde das Produkt als bräunlicher Feststoff erhalten und konnte ohne weitere Ausreinigung eingesetzt werden.

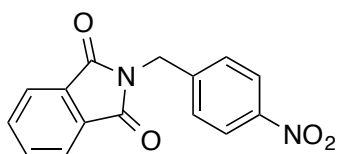
**Ausbeute:** 90% (5.6 g, 23.8 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.55 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.84 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 6.1, 1.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.94 ppm (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 126 MHz) δ 157.0, 148.9, 144.3, 144.1, 136.9, 122.8, 122.3, 121.3, 116.5, 115.0, 113.2, 72.0 ppm. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 235.06327, gefunden 235.06438.



***N*-(3-(4-((3-chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (46b)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **53** (95 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 3-Chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin (55 mg, 0.24 mmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als leicht gelblicher Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 56% (59 mg, 0.09 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 12.31 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 8.54–8.58 (m, 1H), 8.31–8.34 (m, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.80–7.88 (m, 3H), 7.45–7.54 (m, 2H), 7.27–7.37 (m, 3H), 7.10–7.17 (m, 2H), 6.99 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.56 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 16.9, 1.7 Hz, 1H), 5.72–5.77 (m, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.25 (br. s., 4H), 2.66 (br. s., 4H), 2.37 ppm (br. s., 3H). **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 671.26498, gefunden 671.26525.



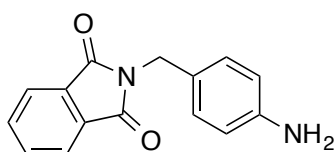
**2-(4-Nitrobenzyl)isoindolin-1,3-dion**

Phthalimid (500 mg, 3.40 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (10 mL) gelöst und mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (939 mg, 6.80 mmol, 2.0 eq) und 4-Nitrobenzylchlorid (641 mg, 3.74 mmol, 1.1 eq) versetzt. Die Suspension wurde für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (25 mL) und EtOAc (25 mL) gestoppt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Zur Entfernung des DMFs wurden die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde durch Flash-säulenchromatographische Aufreinigung als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 83% (797 mg, 2.82 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.11–8.23 (m, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.81–7.98 (m, 4H), 7.52–7.66 (m, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.91 ppm



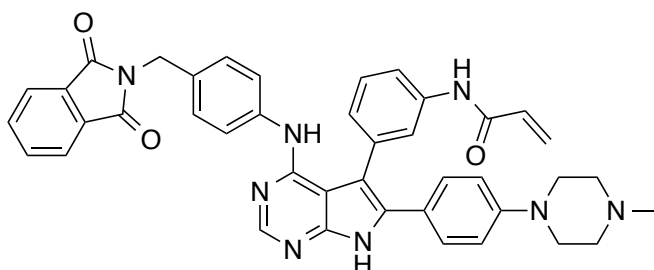
(s, 2H). **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{15}H_{10}N_2O_4+H]^+$  283.07, gefunden n.b. (nicht ionisierbar).



### 2-(4-Aminobenzyl)isoindolin-1,3-dion

2-(4-Nitrobenzyl)isoindolin-1,3-dion (162 mg, 0.57 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 10 mL) gelöst. Nachdem der Kolben mit Argon geflutet wurde, wurde NH<sub>4</sub>Cl (307 mg, 5.74 mmol, 10.0 eq) und Eisenpulver (160 mg, 2.87 mmol, 5.0 eq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Die schwarze Suspension wurde über Celite filtriert und mit 10% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gespült. Das Produkt wurde durch Flashsäulenchromatographische Auftrennung als gelblicher Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 74% (107 mg, 0.42 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 7.80–7.90 (m, 4H), 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.48 (t, *J* = 8.3, 2H), 5.04 (br. s., 2H), 4.57 ppm (s, 2H). **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{15}H_{12}N_2O_2+H]^+$  253.10, gefunden 253.21.

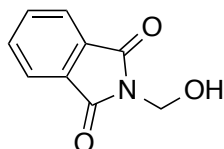


### *N*-(3-(4-((4-((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamide (46c)

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (30 mg, 63 μmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 2-(4-Aminobenzyl)isoindolin-1,3-dion (26 mg, 105 μmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 31% (13 mg, 19 μmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ 12.27 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.86–7.90 (m, 2H), 7.81–7.86 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.27–7.31 (m, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.17–7.22 (m, 3H), 6.84–6.89 (m, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.40 (dd, *J* = 16.9, 10.3 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 16.9, 1.8 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 10.1, 1.7 Hz, 1H), 4.68

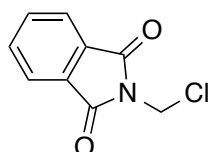
(s, 2H), 3.17 (br. s., 3H), 2.24 ppm (br. s., 4H). **HRMS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_3+\text{H}]^+$  689.29886, gefunden 689.29902.



### 2-(Hydroxymethyl)isoindolin-1,3-dion

Phthalimid (1000 mg, 6.80 mmol, 1.0 eq) wurde in Wasser (3 mL) vorgelegt, mit Paraformaldehyd (714 mg, 23.8 mmol, 3.5 eq) versetzt und für 4 h bei 100 °C refluxiert. Im Anschluss wurde die Lösung in wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung und EtOAc aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum. Das Produkt bleibt als weißer, kristalliner Feststoff zurück und konnte ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt werden.

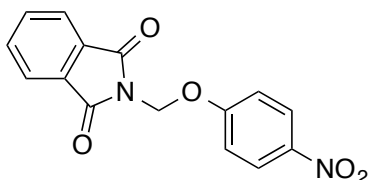
**Ausbeute:** 93% (1123 mg, 6.33 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  7.88 (m, 4H), 6.38 (br. s., 1H), 4.96 ppm (s, 2H). **LC/MS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_3+\text{H}]^+$  178.05, gefunden n.b. (unterhalb der Auflösungsgrenze).



### 2-(Chlormethyl)isoindolin-1,3-dion

2-(Hydroxymethyl)isoindolin-1,3-dion (500 mg, 2.82 mmol, 1.0 eq) wurde in  $\text{SOCl}_2$  (10.0 mL) gelöst und für 16 h bei 70 °C gerührt. Das Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand Flash-säulenchromatographisch aufgereinigt.

**Ausbeute:** 95% (525 mg, 2.68 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  7.90–8.00 (m, 4H), 5.55 ppm (s, 2H).

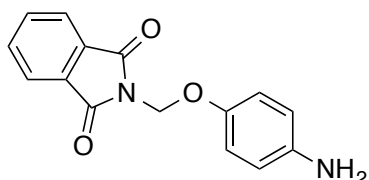


### 2-((4-Nitrophenoxy)methyl)isoindolin-1,3-dion

2-(Chlormethyl)isoindolin-1,3-dion (233.4 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) wurde in Aceton (1 mL) gelöst, mit NaI (289.3 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (164.9 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) versetzt. Nach 15 min Rühren wurde das 4-Nitrophenol

(166 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktion mit Wasser gequenchet und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als gelber Feststoff erhalten.

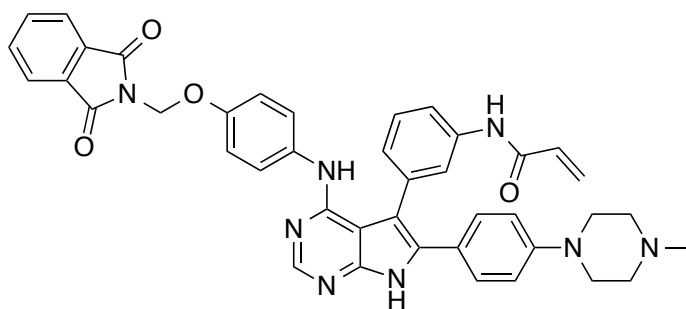
**Ausbeute:** 76% (270 mg, 0.9 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.23 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 7.90–8.00 (m, 4H), 7.34 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 5.73 ppm (s, 2H).



### 2-((4-Aminophenoxy)methyl)isoindolin-1,3-dion

2-((4-Nitrophenoxy)methyl)isoindolin-1,3-dion (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 10 mL) vorgelegt und anschließend wurden NH<sub>4</sub>Cl (125 mg, 3.35 mmol, 10.0 mmol) und Eisenpulver (94 mg, 1.67 mmol, 5.0 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde für 2 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Die abgekühlte Suspension wurde über Celite filtriert und mit EtOAc gespült. Das Lösungsmittel wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als gelber Feststoff erhalten.

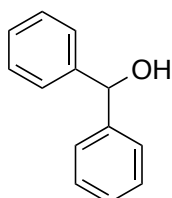
**Ausbeute:** 79% (72 mg, 0.27 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 7.85–7.99 (m, 4H), 6.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.47 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.77 ppm (br. s., 2H). **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 269.09, gefunden 269.17.



### *N*-(3-(4-((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)methoxy)phenyl)amino)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (46d)

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (33 mg, 70 μmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 2-((4-Aminophenoxy)methyl)isoindolin-1,3-dion (28 mg, 105 μmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

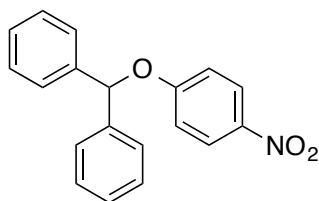
**Ausbeute:** 20% (10 mg, 14  $\mu$ mol).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  12.35 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.92–8.09 (m, 6H), 7.89 (s, 1H), 7.63 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.41 (t,  $J = 9.5$  Hz, 4H), 7.32 (s, 1H), 7.11 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.51 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 6.31–6.39 (m, 1H), 5.86 (dd,  $J = 10.0, 1.7$  Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 3.31 (br. s., 4H), 2.65 (br. s., 3H), 2.41 ppm (br. s., 4H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$  705.29323, gefunden 705.29413.



### Diphenylmethanol

Benzophenon (1.5 g, 8.23 mmol, 1.0 eq) wurde in Ethanol (6 mL) vorgelegt und bei 0 °C mit in Ethanol (9 mL) gelöstem Natriumborhydrid versetzt (205 mg, 5.43 mmol, 0.66 eq). Die Reaktion wurde für 30 min gerührt und anschließend vorsichtig mit Wasser gequentscht. Die wässrige Phase wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als weißer Feststoff erhalten.

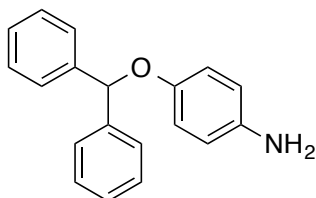
**Ausbeute:** 95% (1.40 g, 7.60 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  = 7.37 (d,  $J = 7.8$  Hz, 4H), 7.29 (t,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 7.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 5.87 (s, 1H), 5.70 ppm (br. s., 1H). **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}+\text{H}]^+$  185.10, gefunden n.b. (unterhalb der Auflösungsgrenze).



### ((4-Nitrophenoxy)methylen)dibenzene

In einem Zweihalskolben wurde Natriumhydrid, 60% in Mineralöl (416 mg, 6.60 mmol, 1.2 eq) in DMF (10 mL) vorgelegt und bei 0 °C mit Diphenylmethanol (1011 mg, 5.49 mmol, 1.0 eq) versetzt. Nach 30 min wurde 1-Fluor-4-nitrobenzol (774 mg, 5.49 mmol, 1.0 eq) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und mit EtOAc extrahiert. Das DMF wurde mit gesättigter NaCl-Lösung ausgewaschen. Das Produkt wurde durch Flash-säulenchromatographische Aufreinigung mittels  $\text{C}_{18}$ -Säule als gelber Feststoff isoliert.

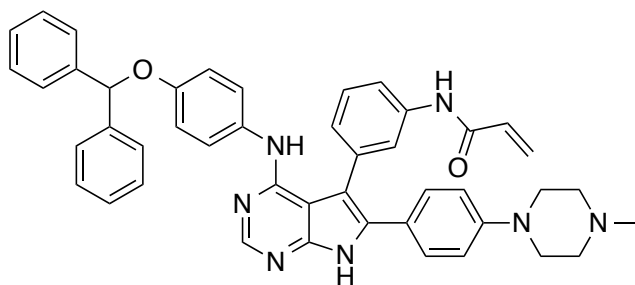
**Ausbeute:** 25% (420 mg, 1,38 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 8.16 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.77 ppm (s, 1H). **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 306.11, gefunden n.b. (nicht ionisierbar).



#### 4-(Benzhydryloxy)anilin

((4-Nitrophenoxy)methylen)dibenzol (420 mg, 1.38 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH:H<sub>2</sub>O (9:2 mL) vorgelegt und mit NH<sub>4</sub>Cl (664 mg, 12.4 mmol, 9.0 eq) versetzt. Bevor das Eisenpulver (231 mg, 4.14 mmol, 3.0 eq) hinzugegeben wurde, wurde der Kolben mit Argon geflutet. Anschließend wurde die Reaktion für 3 h bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und mit technischem Ethanol (75%) gespült. Die Lösung wurde im Vakuum eingedunstet und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als rotbraunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 85% (323 mg, 1.17 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 700 MHz) δ 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.34 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 4.66 ppm (br. s., 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 176 MHz) δ 148.7, 142.8, 142.2, 128.4, 127.3, 126.6, 117.2, 114.8, 81.0 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO+H]<sup>+</sup> 276.14, gefunden 276.13.

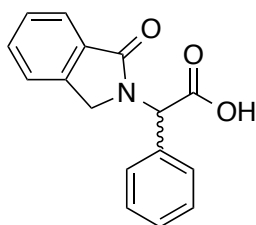


#### N-(3-(4-((4-(Benzhydryloxy)phenyl)amino)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamide (46e)

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **53** (50 mg, 83 μmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 4-(Benzhydryloxy)anilin (34 mg, 124 μmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen. Zur SEM-Entschützung wurde das Produkt

(26 mg, 31  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) umgehend in DMF (1 mL) gelöst und mit Tetrabutylammoniumfluorid (31 mL, 310  $\mu\text{mol}$ , 10.0 eq, 1 M in THF) versetzt. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur und einem Druck von 0.1 mbar gerührt. Durch zweifache Flash-säulenchromatographische Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , dann  $\text{C}_{18}$ -Säule) wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten

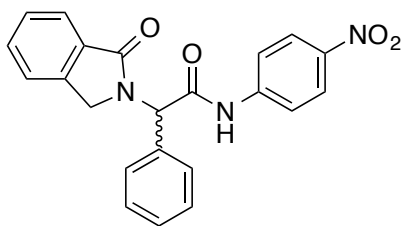
**Ausbeute:** 30% (18 mg, 25  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.24 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.40–7.54 (m, 5H), 7.16–7.39 (m, 10H), 6.84–6.96 (m, 4H), 6.62 (s, 1H), 6.34–6.47 (m, 2H), 6.19–6.27 (m, 1H), 5.72–5.81 (m, 1H), 3.22 (br. s., 4H), 2.63 (br. s., 3H), 2.36 ppm (br. s., 4H), **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_2+\text{H}]^+$  712.34000, gefunden 712.34023.



## 2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetic acid

Phthaldialdehyd (1000 mg, 7.46 mmol, 1.0 eq) und (*R*)- $\alpha$ -Phenylglycin (1239 mg, 8.20 mmol, 1.1 eq) wurden für 20 h in MeCN (40 mL) refluxiert. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (50 mL) und HCl (1 M, 25 mL) gequentscht und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung ( $\text{C}_{18}$ -Säule) als leicht orangener, kristalliner Feststoff gewonnen.

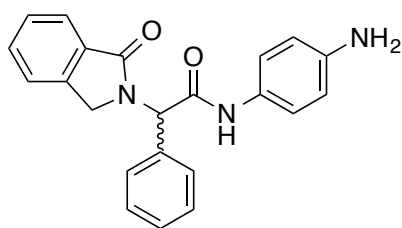
**Ausbeute:** 82% (1644 mg, 6.15 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  13.39 (br. s., 1H), 7.74 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.38–7.61 (m, 8H), 6.00 (s, 1H), 4.63 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H), 3.91 ppm (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  171.8, 168.0, 142.6, 135.1, 132.2, 131.9, 129.5, 129.3, 129.0, 128.5, 124.2, 123.5, 58.4, 48.2 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3+\text{H}]^+$  268.10, gefunden 268.14.



### ***N*-(4-nitrophenyl)-2-(1-oxoisoindolin-2-yl)-2-phenylacetamid**

2-(1-oxoisoindolin-2-yl)-2-phenylessigsäure (267.3 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mit DMF (kat., 1 Tropfen) gelöst und bei 0 °C mit Thionylchlorid (725  $\mu\text{L}$ , 10.0 mmol, 10.0 eq) versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und das überschüssige Thionylchlorid wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.33 M) aufgenommen und 4-Nitroanilin (207.2 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0.66 M) und Triethylamin (209  $\mu\text{L}$ , 1.5 mmol, 1.5 eq) hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 16 h gerührt, mit Wasser gequench und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als orangen Feststoff.

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  11.13 (s, 1H), 8.24 (d,  $J = 9.3$ , 2H), 7.87 (d,  $J = 9.3$ , 2H), 7.75 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J = 7.3$ , 6.4 Hz, 2H), 7.41–7.53 (m, 6H), 6.25 (s, 1H), 4.77 (d,  $J = 17.6$  Hz, 1H), 3.97 ppm (d,  $J = 17.6$  Hz, 1H).

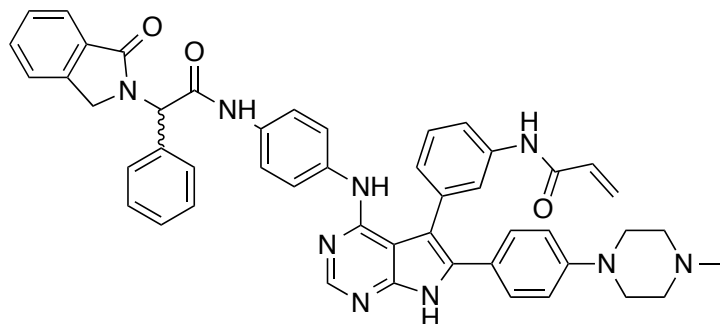


### ***N*-(4-aminophenyl)-2-(1-oxoisoindolin-2-yl)-2-phenylacetamid**

*N*-(4-nitrophenyl)-2-(1-oxoisoindolin-2-yl)-2-phenylacetamid wurde umgehend in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 20 mL) gelöst und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (534.9 mg, 10.0 mmol, 10.0 eq) und Eisenpulver (279.2 mg, 5.0 mmol, 5.0 eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurde die Suspension über Celite filtriert und mit  $\text{EtOAc}$  gespült. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Durch Flash-säulenchromatographische Aufreinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 50% über 2 Schritte (180 mg, 0.50 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  10.14 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.55–7.61 (m, 2H), 7.48–7.52 (m,

1H), 7.42–7.46 (m, 2H), 7.36–7.41 (m, 3H), 7.25 (d,  $J = 9.0$ , 2H), 6.50 (d,  $J = 9.0$ , 2H), 6.18 (s, 1H), 4.93 (br. s., 2H), 4.85 (d,  $J = 17.7$  Hz, 1H), 3.96 ppm (d,  $J = 18.0$  Hz, 1H). **LC/MS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{22}H_{19}N_3O_2+H]^+$  358.16, gefunden 357.98.

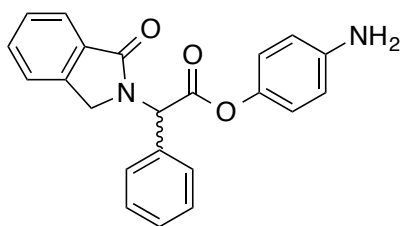


***N*-(3-(6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-((4-(2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetamid)-phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (46f)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und (*R*)-*N*-(4-aminophenyl)-2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetamid (57 mg, 0.16 mmol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 27% (23 mg, 0.03 mmol).  **$^1H$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.28 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.48–7.61 (m, 6H), 7.43 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.34–7.41 (m, 5H), 7.26–7.31 (m,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83–6.89 (m,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.40 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.18–6.29 (m, 2H), 5.75 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 4.83 (d,  $J = 18.0$  Hz, 1H), 3.95 (d,  $J = 18.0$  Hz, 1H), 3.11–3.19 (m, 4H), 2.42 (br. s., 4H), 2.20 ppm (s, 3H).  **$^{13}C$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  168.2, 168.1, 163.9, 153.1, 151.2, 150.9, 150.6, 142.9, 140.3, 136.4, 136.0, 135.7, 133.7, 132.5, 132.2, 132.1, 132.0, 130.5, 129.5, 129.0, 128.9, 128.4, 127.8, 126.3, 124.1, 123.4, 121.5, 121.3, 120.3, 119.9, 119.2, 115.1, 109.8, 104.0, 58.7, 54.9, 48.8, 47.6, 46.1 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{48}H_{43}N_9O_3+H]^+$  794.35671, gefunden 794.35668.

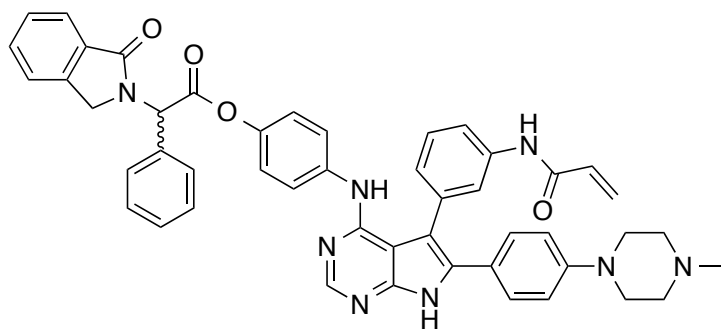




#### 4-Aminophenyl-(*R*)-2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetat

2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylelessigsäure (267.3 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mit DMF (kat., 1 Tropfen) gelöst und bei 0 °C mit Thionylchlorid (725  $\mu\text{L}$ , 10.0 mmol, 10.0 eq) versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Lösungsmittel und Thionylchlorid wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.33 M) aufgenommen. 4-Nitrophenol (208.7 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0.66 M) und Triethylamin (209  $\mu\text{L}$ , 1.5 mmol, 1.5 eq) hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 16 h gerührt, mit Wasser gequench und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelblichen Feststoff (190 mg, 0.49 mmol, 49%). Diese wurde umgehend in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 20 mL) gelöst. Daraufhin wurden  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (261 mg, 4.89 mmol, 10.0 eq) und Eisenpulver (136 mg, 2.45 mmol, 5.0 eq) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 2 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Die abgekühlte Suspension wurde über Celite filtriert und mit EtOAc gespült. Das organische Lösungsmittel wurde mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Zweifache säulenchromatographische Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , dann  $\text{C}_{18}$ -Säule) lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

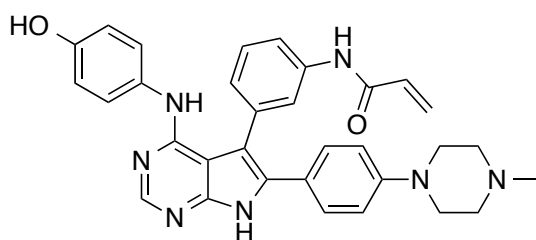
**Ausbeute:** 58% (102 mg, 0.29 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  7.77 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.44–7.63 (m, 8H), 6.80 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.56 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 5.18 (br. s., 2H), 4.63 (d,  $J$  = 17.4 Hz, 1H), 4.03 ppm (d,  $J$  = 17.4 Hz, 1H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  169.8, 168.2, 147.2, 142.6, 140.7, 134.5, 132.4, 131.6, 129.7, 129.4, 129.3, 128.6, 124.3, 123.5, 122.0, 114.6, 58.6, 48.4 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3+\text{H}]^+$  359.14, gefunden 359.03.



**4-((5-(3-acrylamidophenyl)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-4-yl)amino)phenyl-2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetat (46g)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (30 mg, 63  $\mu$ mol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 4-Aminophenyl-(*R*)-2-(1-oxoisindolin-2-yl)-2-phenylacetat (43 mg, 127  $\mu$ mol, 2.0 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

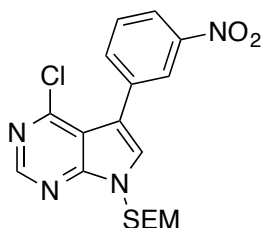
**Ausbeute:** 23% (11 mg, 0.01 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.35 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.77 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (td,  $J$  = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 7.57 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.42–7.54 (m, 9H), 7.30–7.34 (m,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 7.19 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.06–7.10 (m, 2H), 6.89–6.93 (m,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.23 (dd,  $J$  = 16.9, 1.7 Hz, 1H), 5.72–5.76 (m, 1H), 4.62 (d,  $J$  = 17.4 Hz, 1H), 4.06 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H), 2.88 ppm (br. s., 3H), **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{48}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$  795.34073, gefunden 795.34073.



***N*-(3-(4-((4-hydroxyphenyl)amino)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (46h)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **53** (50 mg, 83  $\mu$ mol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 1.25 eq) und 3-Chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin (55 mg, 249  $\mu$ mol, 3.0 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

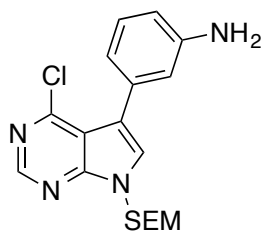
**Ausbeute:** 18% (8 mg, 15  $\mu$ mol).  **$^1\text{H NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.17 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.52 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.25–7.34 (m,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.14–7.23 (m, 3H), 6.82–6.90 (m,  $J$  = 9.3 Hz, 2H), 6.62–6.69 (m, 2H), 6.56 (s, 1H), 6.42 (dd,  $J$  = 17.1, 10.3 Hz, 1H), 6.25 (dd,  $J$  = 17.1, 2.0 Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J$  = 10.0, 1.7 Hz, 1H), 3.17 (br. s., 4H), 2.25 (s, 4H), 1.23 ppm (br. s., 4H), **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2+\text{H}]^+$  546.26175, gefunden 546.26130.



**4-Chlor-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (47)**

Die Verbindung **23** (200 mg, 490  $\mu$ mol, 1.00 eq),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (135 mg, 980  $\mu$ mol, 2.00 eq) und *m*-Nitrophenylboronsäure (98 mg, 588  $\mu$ mol, 1.20 eq) wurden in einem Druckgefäß vorgelegt und in MeCN:Wasser (2:1, 2 mL) gelöst und 15 min mit Argon entgast. Anschließend wurde  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (85 mg, 73.5  $\mu$ mol, 0.15 eq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss mit EtOAc (15 mL) aufgenommen, die organische Phase mit wässriger, gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, das Lösungsmittel über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das gewünschte Produkt.

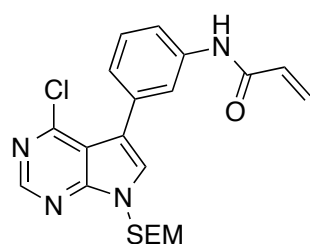
**Ausbeute:** 51% (101 mg, 250  $\mu$ mol).  **$^1\text{H NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.77 (s, 1H), 8.38 (t,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.23–8.27 (m, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.03 (dt,  $J$  = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.77 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 3.61 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 0.87 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.07 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  151.9, 150.9, 150.7, 147.4, 136.5, 134.0, 130.9, 129.5, 124.3, 122.0, 113.6, 73.1, 66.1, 17.1, -1.4 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{Si}+\text{H}]^+$  405.11442, gefunden 405.11625.



### 3-(4-Chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (48)

Die Nitroverbindung **55** (100 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (118 mg, 2.3 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (41.4 mg, 0.8 mmol, 3.0 eq) wurden unter Argonatmosphäre vorgelegt, mit  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1, 1.6 mL) versetzt und die Suspension bei 80 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, über Celite filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Überstand wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt und das Produkt ohne weitere Aufarbeitung als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** quant. (93 mg, 0.3 mmol).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.69 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.07 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.64 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.58 (dd,  $J = 8.0, 1.1$  Hz, 1H), 5.68 (s, 2H), 5.13 (br. s., 2H), 3.57 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 0.84 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), -0.09 ppm (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  151.6, 150.8, 150.4, 148.1, 132.7, 129.2, 128.3, 117.8, 116.9, 115.7, 114.2, 112.9, 72.8, 66.0, 17.1, -1.5 ppm. **HRMS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{OSi}+\text{H}]^+$  375.14024, gefunden 375.14170.

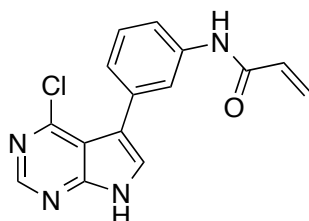


### N-(3-(4-chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (49)

Das Amin **56** (100 mg, 267  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurde in trockenem THF (2 mL) gelöst und mit DIPEA (465  $\mu\text{L}$ , 2.7 mmol, 10.00 eq) versetzt. Eine Lösung aus Acryloylchlorid (33  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) in THF (1 mL) wurde bei 0 °C hinzugefügt und die Reaktion bis zum vollständigem Umsatz gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter, wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gequenchet, die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, das Lösungsmittel über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und

anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung als blass gelber Feststoff erhalten.

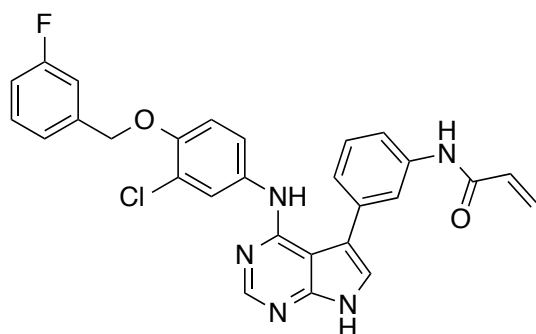
**Ausbeute:** 79% (90 mg, 211  $\mu$ mol).  **$^1\text{H}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  10.22 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.40 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 6.46 (dd,  $J$  = 17.2, 10.3 Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J$  = 17.2, 1.9 Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J$  = 10.3, 1.9 Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 3.59 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.09 ppm (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  163.2, 151.7, 150.8, 150.6, 138.7, 132.8, 131.8, 129.7, 128.3, 126.9, 125.3, 121.0, 118.2, 115.9, 114.1, 72.9, 66.0, 17.1, -1.5 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{Si}+\text{H}]^+$  429.15081, gefunden 429.15199.



#### ***N*-(3-(4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus Verbindung **57** (565.0 mg, 1.3 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zweifache Flash-säulenchromatographische Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , dann  $\text{C}_{18}$ -Säule) lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

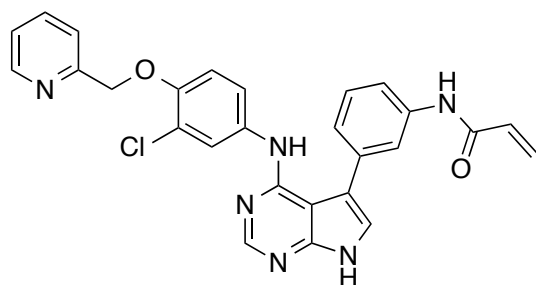
**Ausbeute:** 90% (353 mg, 1.18 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$  10.22 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.78 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.39 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J$  = 16.9, 10.3 Hz, 1H), 6.27 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 5.77 ppm (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}+\text{H}]^+$  299.07, gefunden 299.33.



***N*-(3-(4-((3-chloro-4-((3-fluorobenzyl)oxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50a)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (60 mg, 139.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), konz. HCl (37%ig) (1.7  $\mu\text{L}$ , 21.0  $\mu\text{mol}$ , 0.15 eq) und 3-chlor-4-((3-fluorobenzyl)oxy)anilin (52.8 mg, 209.8  $\mu\text{mol}$ , 1.50 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 44% (32 mg, 61.8  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.10 (br. s., 1H), 10.30 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.42–7.48 (m, 2H), 7.40 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J = 8.8, 2.3$  Hz, 1H), 7.24–7.32 (m, 3H), 7.17 (dd,  $J = 8.8, 1.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 16.8, 10.3$  Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 16.8, 1.5$  Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J = 10.3, 1.5$  Hz, 1H), 5.19 ppm (s, 2H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  163.4, 153.4, 151.5, 148.8, 139.7, 139.6, 135.4, 133.7, 131.7, 130.5, 130.4, 129.5, 127.0, 123.8, 123.2, 122.3, 121.6, 121.2, 120.4, 119.2, 115.3, 114.7, 114.6, 114.5, 114.0, 113.8, 100.7, 69.4 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{ClFN}_5\text{O}_2+\text{H}]^+$  514.14406, gefunden 514.14491.

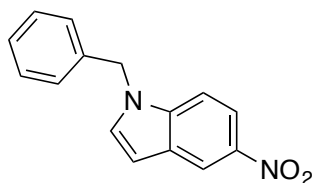


***N*-(3-(4-((3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50b)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (60 mg, 139.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), konz. HCl (37%ig) (1.7  $\mu\text{L}$ , 21.0  $\mu\text{mol}$ , 0.15 eq) und

3-chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin (49.2 mg, 209.8  $\mu\text{mol}$ , 1.50 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

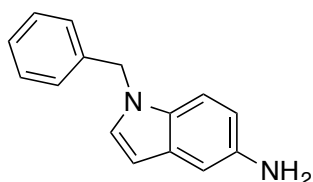
**Ausbeute:** 62% (43 mg, 86.5  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.11 (br. s., 1H), 10.31 (s, 1H), 8.58 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.45 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.32–7.37 (m, 2H), 7.26 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.14 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 16.8, 10.3$  Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J = 16.8, 1.5$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J = 10.3, 1.5$  Hz, 1H), 5.23 ppm (s, 2H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  163.4, 156.4, 153.4, 151.5, 150.9, 149.0, 148.9, 139.6, 137.0, 135.4, 133.6, 131.7, 129.5, 127.0, 123.8, 122.9, 122.3, 121.6, 121.3, 121.0, 120.4, 119.2, 117.7, 115.3, 114.4, 100.7, 71.2 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_2+\text{H}]^+$  497.14873, gefunden 497.14987.



### 1-benzyl-5-nitro-1H-indol

Natriumhydrid, 60% in Paraffinöl (148.0 mg, 3.7 mmol, 1.2 eq) wurde in DMF (5 mL) gelöst, 5-nitro-1H-indol zugegeben (500.0 mg, 3.1 mmol, 1.0 eq) und 30 min bei 0 °C gerührt. Danach wurde Benzylchlorid (425.8  $\mu\text{L}$ , 3.7 mmol, 1.2 eq) hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (2 h). Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser gegeben und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

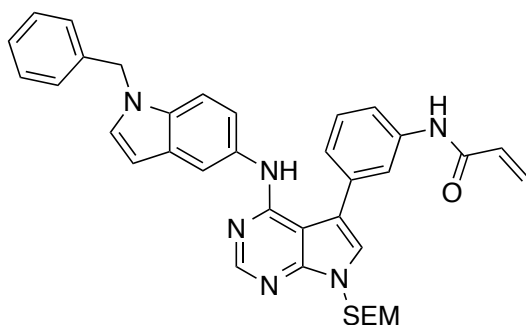
**Ausbeute:** 98% (763.6 mg, 3.0 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.58 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 9.1, 2.1$  Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.29–7.19 (m, 3H), 6.81 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 5.53 ppm (s, 2H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  140.85, 138.68, 137.45, 132.98, 128.69, 127.63, 127.56, 127.07, 117.65, 116.56, 110.69, 104.03, 49.47, 39.52 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2+\text{H}]^+$  253.10, gefunden 253.12.



### 1-benzyl-1*H*-indol-5-amin

1-benzyl-5-nitro-1*H*-indole (740.0 mg, 2.9 mmol, 1.0 eq),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.42 g, 26.4 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (491.4 mg, 8.8 mmol, 3.0 eq) wurden vorgelegt und in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1, 47 mL) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 80 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (1 h). Das Reaktionsgemisch wurde über Celite gefiltert und der Durchfluss im Vakuum eingengt, der Rückstand mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als dunkles Öl.

**Ausbeute:** 93% (606.4 mg, 2.73 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.28 (dd,  $J = 9.3, 5.1$  Hz, 3H), 7.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J = 8.6, 2.1$  Hz, 1H), 6.17 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.50 ppm (s, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  141.44, 138.68, 129.73, 129.28, 128.59, 128.41, 127.15, 126.90, 111.81, 110.19, 103.53, 99.38, 49.10, 39.52 ppm. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2+\text{H}]^+$  223.12, gefunden 223.18.

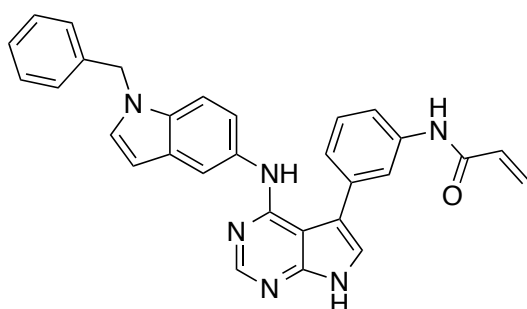


### *N*-(3-(4-((1-benzyl-1*H*-indol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (80.0 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq), konz. HCl (37%ig) (2.3  $\mu\text{L}$ , 0.03 mmol, 0.15 eq) und 1-benzyl-1*H*-indol-5-amin (62.2 mg, 0.28 mmol, 1.50 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.



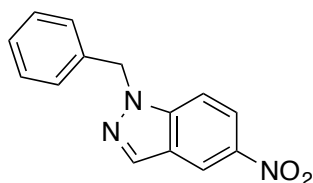
**Ausbeute:** 72% (82.7 mg, 0.13 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.33 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.49–7.47 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.04 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 3.1, 0.6 Hz, 1H), 6.28 (dd, *J* = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.78 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 3.62–3.56 (m, 2H), 0.89–0.84 (m, 2H), -0.06 ppm (s, 9H). **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Si+H]<sup>+</sup> 615.29, gefunden 615.47.



***N*-(3-(4-((1-benzyl-1*H*-indol-5-yl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50c)**

Zu einer Lösung aus *N*-(3-(4-((1-benzyl-1*H*-indol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (80.0 mg, 0.13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) wurde Trifluoressigsäure (4 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Wasser und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Aufreinigung mittels HPLC lieferte das Produkt als gelben Feststoff.

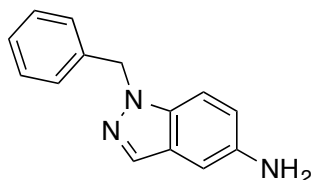
**Ausbeute:** 10% (6.9 mg, 0.01 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.02 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.52–7.46 (m, 2H), 7.37–7.26 (m, 6H), 7.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.28 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 5.38 ppm (s, 2H). **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>ON<sub>6</sub>+H]<sup>+</sup> 485.20844, gefunden 485.20798.



### 1-Benzyl-5-nitro-1H-indazol

5-Nitroindazol (326 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (6 mL) gelöst und mit  $K_2CO_3$  (553 mg, 4.0 mmol, 2.0 eq) versetzt. Anschließend wurde Benzylbromid (0.29 mL, 2.4 mmol, 2.0 eq) hinzugetropft und für 5 h gerührt. Zum Reaktionsgemisch wurde Wasser (20 mL) zugegeben und es mit EtOAc extrahiert. Nachdem das DMF durch Waschen des organischen Lösungsmittels mit gesättigter NaCl-Lösung entfernt wurde, wurde dieses über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde Flash-säulenchromatographisch vom zusätzlich entstandenen Regioisomer getrennt und konnte als gelber Feststoff isoliert werden.

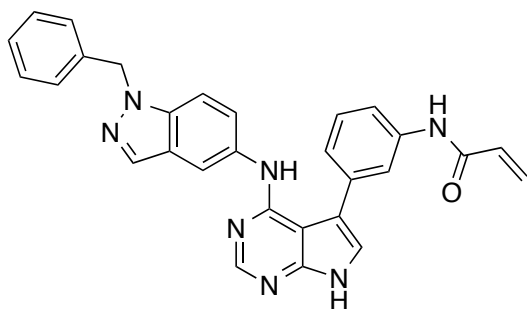
**Ausbeute:** 41% (210 mg, 0.83 mmol).  **$^1H$  NMR** ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$  8.82 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 8.44 (d,  $J$  = 0.7 Hz, 1H), 8.21 (dd,  $J$  = 9.2, 2.2 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 7.29–7.33 (m, 2H), 7.23–7.28 (m, 3H), 5.75 ppm (s, 2H).  **$^{13}C$  NMR** ( $CDCl_3$ , 151 MHz)  $\delta$  147.0, 146.3, 142.0, 141.8, 133.9, 133.9, 133.0, 132.7, 132.6, 128.1, 126.3, 124.4, 115.9, 57.4, 57.4 ppm. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{14}H_{11}N_3O_2+H]^+$  254.09, gefunden 254.13.



### 1-Benzyl-1H-indazol-5-amin

Zu einer Lösung aus 1-Benzyl-5-nitro-1H-indazol (140 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq) in EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 15 mL) wurde  $NH_4Cl$  (296 mg, 5.52 mmol, 10.0 eq) gegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Argon-Athmosphäre mit Eisenpulver (154 mg, 2.76 mmol, 5.0 eq) versetzt und für 3 h bei 60 °C im Ultraschallbad sonifiziert. Die schwarze Suspension wurde mit EtOAc (20 mL) verdünnt und über Celite filtriert. Das organische Lösungsmittel wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als orangener, kristalliner Feststoff gewonnen.

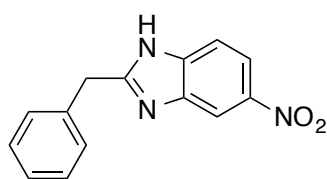
**Ausbeute:** 98% (120 mg, 0.54 mmol).  **$^1H$  NMR** ( $DMSO-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  7.75 (s, 1H), 7.16–7.35 (m, 6H), 6.74–6.80 (m, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.81 ppm (s, 2H). **LC/MS:** m/z berechnet für  $[C_{14}H_{13}N_3+H]^+$  224.12, gefunden 224.21.



***N*-(3-(4-((1-Benzyl-1*H*-indazol-5-yl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-phenyl)-acrylamid (50d)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (50 mg, 116.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und 1-Benzyl-1*H*-indazol-5-amin (39 mg, 175  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

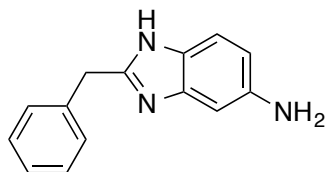
**Ausbeute:** 66% (37 mg, 76  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.05–12.18 (m, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.23 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.48 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 7.22–7.32 (m, 5H), 7.17–7.21 (m, 2H), 6.47 (dd,  $J$  = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J$  = 17.1, 1.8 Hz, 1H), 5.75–5.80 (m, 1H), 5.62 ppm (s, 2H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  163.9, 154.5, 151.8, 151.6, 140.1, 138.1, 136.8, 136.1, 133.3, 133.2, 132.2, 130.1, 129.0, 127.9, 127.7, 127.7, 124.4, 124.3, 122.7, 121.9, 119.8, 118.2, 115.8, 111.7, 110.3, 101.2, 52.4 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}+\text{H}]^+$  486.20423, gefunden 486.20356.



**2-Benzyl-5-nitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol**

Phenyllessigsäure (1360 mg, 10.0 mmol, 1.0 eq) und 4-Nitrobenzol-1,2-diamin (1530 mg, 10.0 mmol, 1.0 eq) wurden ohne Zugabe von Lösungsmittel für 1 h bei 180 °C in einem Mikrowellenreaktor gerührt. Der schwarze Feststoff wurde in 100 mL Wasser aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flashsäulenchromatographischer Aufreinigung ( $\text{C}_{18}$ -Säule) als orangener, kristalliner Feststoff gewonnen.

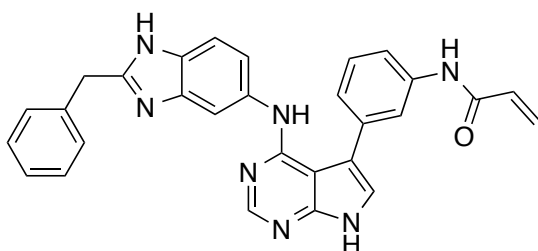
**Ausbeute:** 20% (507 mg, 2.0 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  13.00 (br. s., 1H), 8.44 (br. s., 1H), 8.07 (br. s., 1H), 7.61 (br. s., 1H), 7.29–7.40 (m, 4H), 7.21–7.29 (m, 1H), 4.26 ppm (s, 2H).



### 2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-amin

2-Benzyl-5-nitro-1H-benzo[d]imidazol (368 mg, 1.45 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 25 mL) gelöst und unter Argon-Atmosphäre NH<sub>4</sub>Cl (777 mg, 14.5 mmol, 10.0 eq) und Eisenpulver hinzugefügt (406 mg, 7.27 mmol, 5.0 eq). Die Reaktion wurde für 5 h bei 60 °C im Ultraschallbad behandelt. Das Gemisch wurde in EtOAc (50 mL) aufgenommen, über Celite filtriert und mit EtOAc gespült. Das Lösungsmittel wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum entfernt. Flashsäulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als orangenen, kristallinen Feststoff.

**Ausbeute:** 79% (255 mg, 1.14 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  7.26–7.33 (m, 4H), 7.18–7.25 (m, 1H), 7.14 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 6.59 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J$  = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 4.05 ppm (s, 2H). **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 224.12, gefunden 224.19.

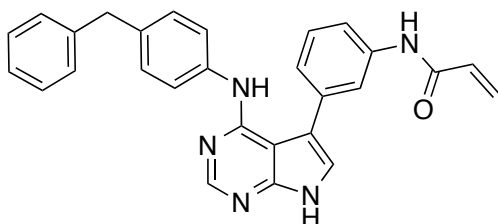


### N-(3-(4-((2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-phenyl)acrylamid (50e)

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (50 mg, 116.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und 2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-amine (39 mg, 175  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 75% (42.5 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.11 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.39–8.42 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.26 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.67–7.71 (m, 1H), 7.47–7.52 (m, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.40 (d,  $J$  =

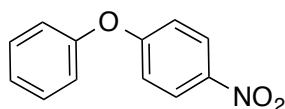
2.4 Hz, 1H), 7.27–7.36 (m, 6H), 7.02 (dd,  $J = 9.3, 2.0$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 16.9, 2.0$  Hz, 1H), 5.75–5.80 (m, 1H), 5.60 ppm (s, 2H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  163.9, 154.3, 151.7, 151.6, 146.1, 140.2, 137.6, 136.1, 133.3, 132.2, 130.2, 129.0, 128.3, 128.2, 127.7, 124.4, 124.1, 123.1, 121.9, 121.8, 119.8, 118.3, 117.8, 115.7, 109.3, 101.3, 56.7 ppm. **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}+\text{H}]^+$  486.20423, gefunden 486.20352.



### ***N*-(3-(4-((4-benzylphenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50f)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (80.0 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq), HCl (25%ig) (3.4  $\mu\text{L}$ , 0.03 mmol, 0.15 eq) und 4-benzylanilin (61.5 mg, 0.34 mmol, 1.80 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

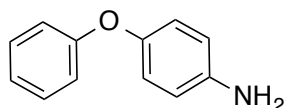
**Ausbeute:** 3% (2.8 mg, 6.3 nmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.11–12.06 (m, 1H), 10.29 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.99–7.92 (m, 1H), 7.69–7.65 (m, 1H), 7.47 (d,  $J = 8.5$  Hz, 3H), 7.39 (s, 2H), 7.26 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 7.21 (s, 2H), 7.19–7.15 (m, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.49–6.42 (m, 1H), 6.29–6.22 (m, 1H), 5.79–5.74 ppm (m, 1H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{ON}_5+\text{H}]^+$  446.19754, gefunden 446.19624.



### **1-nitro-4-phenoxybenzen**

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid, 60% in Parafinöl (170.1 mg, 4.25 mmol, 1.2 eq) in DMF (5 mL) wurde Phenol (400.2 mg, 4.25 mmol, 1.2 eq) und 4-Fluor-1-Nitrobenzol (376  $\mu\text{L}$ , 3.54 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt, in Wasser gegeben und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

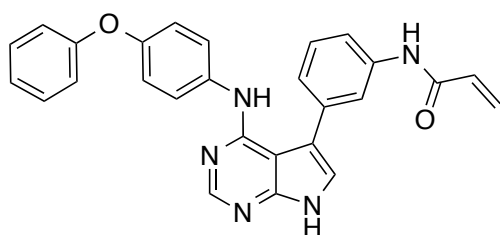
**Ausbeute:** 66% (505.6 mg, 2.3 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.28–8.23 (m, 2H), 7.53–7.48 (m, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.6, 0.9 Hz, 2H), 7.15–7.10 ppm (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.37, 154.74, 142.70, 131.04, 126.68, 126.00, 120.97, 117.81 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 216.07, gefunden n.b. (nicht ionisierbar).



#### 4-phenoxyanilin

Zu einer Lösung aus 1-nitro-4-phenoxybenzen (480.0 mg, 2.23 mmol, 1.0 eq) in EtOH:H<sub>2</sub>O (16:4 mL) wurde NH<sub>4</sub>Cl (1074 mg, 20.07 mmol, 9.0 eq) und Eisenpulver (373.7 mg, 6.69 mmol, 3.0 eq) gegeben. Die Mischung wurde unter Reflux bis zum vollständigen Umsatz gerührt (1 h), über Celite filtriert, mit Wasser gewaschen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als dunkles Öl.

**Ausbeute:** quant. (448.4 mg, 2.4 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.29 (dd, *J* = 8.5, 7.5 Hz, 2H), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.77–6.74 (m, 2H), 6.61–6.57 (m, 2H), 4.97 ppm (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.99, 145.50, 145.42, 129.66, 121.69, 120.93, 116.38, 114.85, 39.52 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO+H]<sup>+</sup> 186.09, gefunden 186.10.

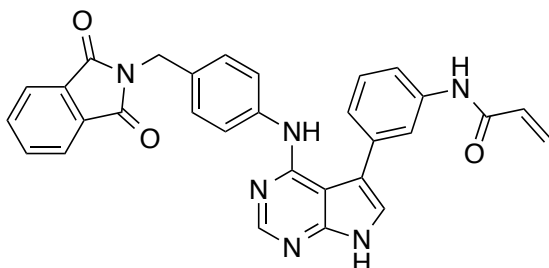


#### *N*-(3-(4-((4-phenoxyphenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50g)

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde das SEM-geschützte 4-Chlor-pyrrolopyrimidin **57** (80.0 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq), HCl (25%ig) (3.4 µL, 0.03 mmol, 0.15 eq) und 4-phenoxyanilin (62.2 mg, 0.34 mmol, 1.80 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 2% (1.9 mg, 4.3 µmol). **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.14 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 2H), 7.28

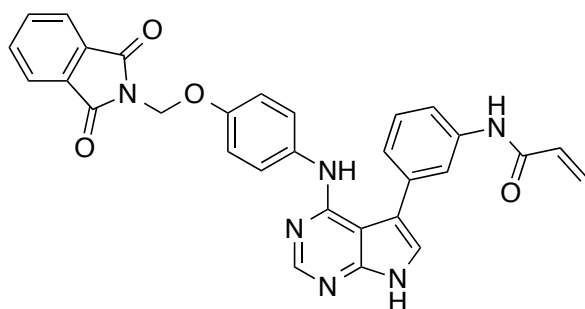
(d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 15.6, 8.4$  Hz, 4H), 6.46 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.26 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{27}H_{22}O_2N_5+H]^+$  448.17680, gefunden 448.17531.



***N*-(3-(4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50h)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (40 mg, 134  $\mu$ mol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und 2-(4-Aminobenzyl)isindoline-1,3-dione (51 mg, 201  $\mu$ mol, 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute**: 67% (47 mg, 90  $\mu$ mol).  **$^1H$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  12.86 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.76–7.81 (m, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.36 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.27–7.32 (m,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.06 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.85–6.89 (m,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.42 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 16.9, 2.0$  Hz, 1H), 5.72–5.76 (m, 1H), 3.13–3.21 (m, 4H), 2.35–2.42 (m, 4H), 2.19 ppm (s, 3H). **HRMS**:  $m/z$  berechnet für  $[C_{30}H_{22}N_6O_3+H]^+$  515.18316, gefunden 515.18252.

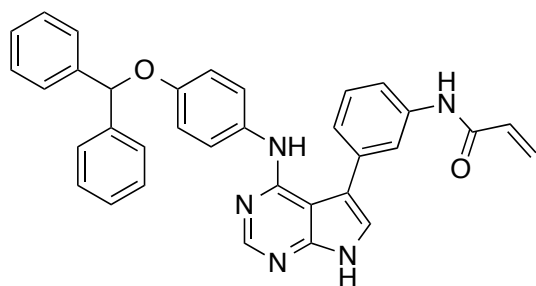


***N*-(3-(4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (50i)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (40 mg, 134  $\mu$ mol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und

2-((4-Aminophenoxy)methyl)isoindolin-1,3-dion (54 mg, 201  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 83% (59 mg, 111  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  12.35 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.92–8.09 (m, 6H), 7.89 (s, 1H), 7.63 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.41 (t,  $J = 9.5$  Hz, 4H), 7.32 (s, 1H), 7.11 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.51 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 6.31–6.39 (m, 1H), 5.86 (dd,  $J = 10.0, 1.7$  Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 3.31 (br. s., 4H), 2.65 (br. s., 3H), 2.41 ppm (br. s., 4H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4+\text{H}]^+$  531.17808, gefunden 531.17744.

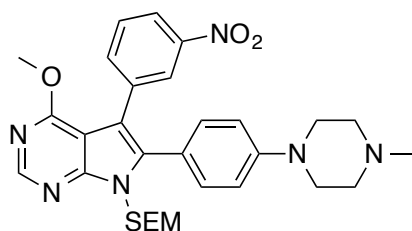


***N*-(3-(4-((4-(benzhydryloxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-phenyl)acrylamid (50j)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (65 mg, 218  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und 4-(Benzhydryloxy)anilin (90 mg, 326  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 43% (50 mg, 93  $\mu\text{mol}$ ).  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz)  $\delta$  12.27 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.86–7.90 (m, 2H), 7.81–7.86 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.51 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.27–7.31 (m,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.17–7.22 (m, 3H), 6.84–6.89 (m,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.40 (dd,  $J = 16.9, 10.3$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 16.9, 1.8$  Hz, 1H), 5.73 (dd,  $J = 10.1, 1.7$  Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.17 (br. s., 4H), 2.24 ppm (br. s., 3H). **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2+\text{H}]^+$  538.22430, gefunden 538.22417.

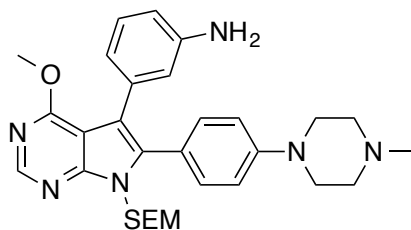




**4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (51)**

6-brom-4-methoxy-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (400.0 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq), 4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenylboronsäure Pinacolester (302.6 mg, 1.0 mmol, 1.2 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (50.0 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (288.0 mg, 2.1 mmol, 2.5 eq) wurden unter Ar-Atmosphäre in einem Schlenk-Röhrchen vorgelegt und 3 mL *Freeze-pump-thaw*-entgastes Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (16 h) bei 80 °C gerührt, wobei sie sich rot-braun färbte. Die resultierende Lösung wurde über Celite filtriert und der Durchfluss in EtOAc und Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organische Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

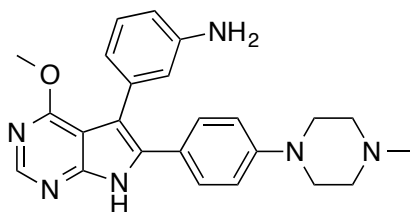
**Ausbeute:** 93% (444.0 mg, 0.8 mmol) **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.50 (s, 1H), 8.14–8.11 (m, 1H), 8.04–8.01 (m, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.53–3.47 (m, 2H), 3.18–3.12 (m, 4H), 2.41–2.36 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 0.82–0.76 (m, 2H), -0.12 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.19, 152.51, 150.94, 150.87, 147.20, 137.55, 137.05, 135.53, 131.84, 128.90, 125.29, 120.97, 118.02, 114.41, 110.79, 103.13, 73.54, 70.50, 65.97, 54.43, 53.65, 47.05, 45.73, 39.52, 24.95, 17.30, -1.48. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si+H]<sup>+</sup> 575.28, gefunden 575.31.



### 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (52)

Eine Lösung aus 4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-(3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (240.0 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq), Eisenpulver (120.0 mg, 2.0 mmol, 5.0 eq) und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (224.0 mg, 4.2 mmol, 10.0 eq) in  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1) wurde für 3 h auf 60 °C im Ultraschallbad erhitzt. Anschließend wurde die resultierende Lösung über Celite filtriert, mit MeOH gewaschen und der Durchfluss im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 88% (200.0 mg, 0.4 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.46 (s, 1H), 7.20 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 6.87 (t,  $J = 11.0$  Hz, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.40 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 6.32 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.54–3.46 (m, 2H), 3.17 (s, 4H), 2.43 (s, 4H), 2.21 (s, 3H), 0.84–0.74 (m, 2H), -0.11 (s, 9H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  162.36, 152.27, 150.36, 147.79, 135.95, 134.36, 131.67, 127.82, 119.50, 118.85, 116.79, 114.16, 113.92, 112.29, 103.70, 70.49, 65.83, 54.54, 53.52, 47.08, 45.70, 39.52, 17.33, -1.40. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_2\text{Si}+\text{H}]^+$  545.31, gefunden 545.39.

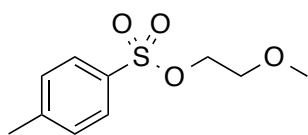


### 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (31j)

Zu einer Lösung aus 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (180 mg, 0.3 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

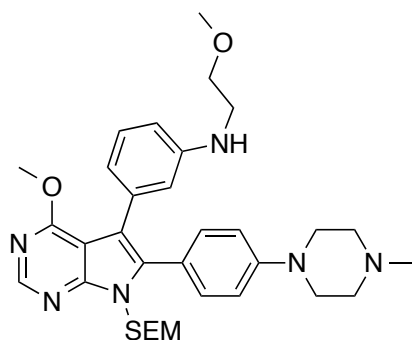
**Ausbeute:** 81% (111 mg, 0.3 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.28 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.14 (dd [app. t],  $J = 7.8, 7.8$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 6.86 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.69 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 6.61 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.68 (br s, 2H), 3.10 (s, 4H), 2.53 (s, 4H), 2.34 ppm (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.28, 163.03, 152.06, 150.20, 149.58, 146.05, 135.86, 134.01, 129.14, 128.70, 121.90, 118.41, 115.18, 113.27, 111.18, 106.04, 55.06, 53.50, 47.91, 46.12 ppm. **HRMS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}+\text{H}]^+$  415.22334, gefunden 415.22409.



### 2-methoxyethyl 4-methylphenylsulfonat

Zu einer Lösung aus 4-toluolsulfonsäurechlorid (2.7 g, 14.4 mmol, 1.1 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde bei 0 °C über 15 min 2-methoxyethan-1-ol (1.0 g, 13.1 mmol, 1.0 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben. Anschließend wurde über 20 min eine Lösung von  $\text{Et}_3\text{N}$  (2.2 mL, 15.7 mmol, 1.2 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (65 mL) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur über Nacht (12 h) gerührt. Die Mischung wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und Wasser verdünnt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl, gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ - und NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als klares Öl.

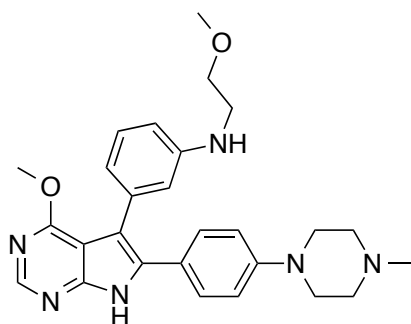
**Ausbeute:** 92% (2.78 g, 12.1 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.79 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 4.11 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 3.48 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 3.17 (s, 3H), 2.41 ppm (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  144.96, 132.39, 130.16, 127.65, 69.76, 69.27, 57.94, 21.08 ppm. **LC/MS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$  231.07, gefunden 230.95.



**3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin (53a)**

Eine Lösung aus 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (113.5 mg, 0.2 mmol, 1.5 eq.), 2-methoxyethyl 4-methylphenylsulfonat (32 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.), KI (23.1 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (48.0 mg, 0.3 mmol, 2.5 eq.) in DMF (3 mL/mmol Anilin-Derivat) wurden in einem sealed-tube für 72 h bei 80 °C gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc und Wasser verdünnt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

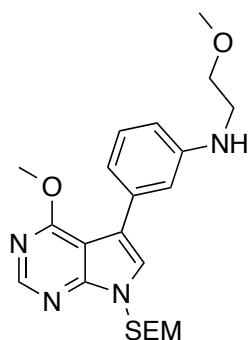
**Ausbeute:** 53%, 82% BRSM (45.0 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.49 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.03 (dd [app. t], *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.49 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.64 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.30 (s, 4H), 3.16 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.66 (s, 4H), 2.42 (s, 3H), 0.94 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), -0.05 ppm (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.16, 152.99, 150.75, 150.53, 147.47, 136.51, 134.88, 132.37, 128.31, 121.37, 121.03, 115.91, 115.29, 114.53, 111.95, 104.45, 71.08, 70.91, 66.60, 58.85, 54.91, 53.70, 48.05, 45.89, 43.66, 18.08, -1.29 ppm. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Si+H]<sup>+</sup> 603.35, gefunden 603.23.



**3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin (53b)**

Zu einer Lösung aus 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin (60.0 mg, 0.1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

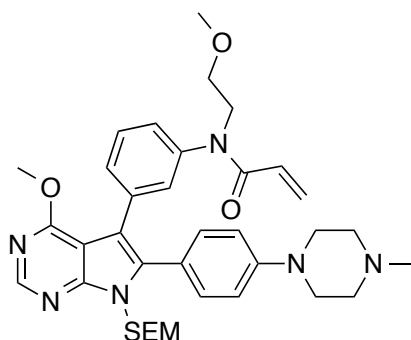
**Ausbeute:** 77% (36.0 mg, 0.1 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.15 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.32 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.16 (dd [app. t],  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.81 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 6.61 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.58 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.29 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 3.24 (s, 4H), 2.62 (s, 4H), 2.40 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.29, 152.31, 150.29, 149.82, 147.93, 135.64, 133.94, 129.35, 128.72, 122.83, 121.08, 116.09, 115.38, 111.93, 111.85, 106.20, 71.18, 58.90, 55.00, 53.65, 48.00, 46.04, 43.77. **HRMS:** m/z berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_2+\text{H}]^+$  473.26595, gefunden 473.26404.



### 3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin (53c)

Eine Lösung aus 3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)anilin (404.0 mg, 1.1 mmol, 1.5 eq.), 2-methoxyethyl 4-methylphenylsulfonat (167.0 mg, 0.7 mmol, 1.0 eq.), KI (120.4 mg, 0.7 mmol, 1.0 eq.) und  $K_2CO_3$  (250.6 mg, 1.8 mmol, 2.5 eq.) in DMF (3 mL/mmol Anilin-Derivat) wurden in einem sealed-tube für 72 h bei 80 °C gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc und Wasser verdünnt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als gelbes Öl.

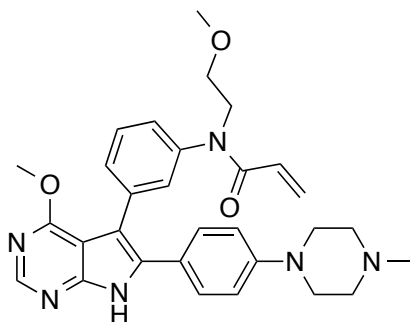
**Ausbeute:** 65%, 90% BRSM (203 mg, 0.5 mmol).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.51 (s, 1H), 7.28 (dd [app. t],  $J$  = 4.2, 4.2 Hz, 1H), 7.22 (dd [app. t],  $J$  = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.05–7.00 (m, 2H), 6.64 (dd,  $J$  = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.65 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (s, 1H), 3.58 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.37 (t,  $J$  = 2.7 Hz, 2H), 0.94 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.04 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.52, 153.08, 151.25, 147.99, 134.85, 129.07, 123.65, 118.48, 118.38, 113.68, 112.24, 103.44, 73.09, 71.05, 66.51, 58.80, 53.71, 43.78, 17.79, -1.36. **LC/MS:**  $m/z$  berechnet für  $[C_{22}H_{32}N_4O_3Si+H]^+$  429.23, gefunden 429.38.



***N*-(3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus 3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-*N*-(2-methoxyethyl)anilin (73.0 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (36.8 mg, 0.3 mmol, 2.2 eq.) in THF, wurde bei 0 °C über 15 min tropfenweise eine Lösung aus Acryloylchlorid (11.8 µL, 0.1 mmol, 1.2 eq.) in THF (10 mL/mmol Anilin-Derivat) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht (12 h) gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc und Wasser verdünnt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl, gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>- und NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißer Feststoff.

**Ausbeute:** 65% (51.0 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (s, 1H), 7.34 (dd [app. t], *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.06 (dt, *J* = 6.9, 2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.36 (dd, *J* = 16.8, 2.1 Hz, 1H), 6.03 (dd, *J* = 16.8, 10.3 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.50 (dd, *J* = 10.3, 2.0 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.89 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.69 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.35 (s, 4H), 3.32 (s, 3H), 2.70 (s, 4H), 2.46 (s, 3H), 0.98 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 0.00 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.69, 163.06, 153.09, 151.08, 150.81, 141.30, 137.16, 135.91, 132.42, 130.95, 130.68, 128.79, 128.64, 127.55, 126.21, 120.49, 115.35, 112.96, 104.21, 70.96, 69.32, 66.75, 58.66, 54.87, 53.75, 48.72, 47.89, 45.87, 18.10, -1.30. **LC/MS:** *m/z* berechnet für [C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si+H]<sup>+</sup> 657.36, gefunden 657.54.

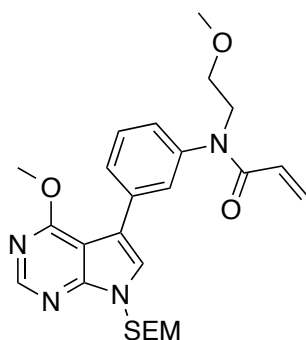


***N*-(3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid (54a)**

Zu einer Lösung aus *N*-(3-(4-methoxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamide (51 mg, 0.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

**Ausbeute:** 79% (32 mg, 0.1 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.30 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (dd [app. t], *J* = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.38 (dd, *J* = 16.8, 1.9 Hz, 1H), 6.17 (dd, *J* = 16.7, 10.3 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 10.2, 1.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.97 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.33 (s, 4H), 3.31 (s, 3H), 2.66 (s, 4H), 2.43 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.72, 163.22, 152.46, 150.80, 150.05, 141.72, 136.40, 134.67, 131.12, 130.75, 129.64, 128.96, 128.91, 127.62, 126.46, 122.23, 115.57, 110.28, 105.83, 69.45, 58.69, 54.94, 53.77, 48.87, 48.08, 46.03. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 527.27652, gefunden 527.27709, berechnet für [C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> 549.25846, gefunden 549.25914.

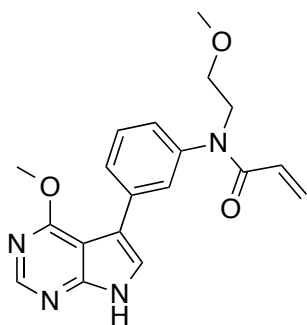




***N*-(3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid**

Zu einer Lösung aus 3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-*N*-(2-methoxyethyl)anilin (165.0 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq.) und  $K_2CO_3$  (117.0 mg, 0.8 mmol, 2.2 eq.) in THF, wurde bei 0 °C über 15 min tropfenweise eine Lösung aus Acryloylchlorid (37.5  $\mu$ L, 0.5 mmol, 1.2 eq.) in THF (10 mL/mmol Anilin-Derivat) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht (12 h) gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc und Wasser verdünnt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl, gesättigter wässriger  $NaHCO_3$ - und NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flash-Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als klares Öl.

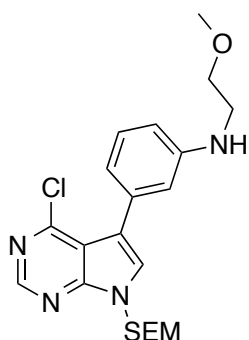
**Ausbeute:** 89% (165 mg, 0.3 mmol).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.48 (s, 1H), 7.58 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (dd [app. t],  $J = 7.8, 7.8$  Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.12 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.37 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J = 16.7, 10.3$  Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.51 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.98 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 3.58 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.54 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.29 (s, 3H), 0.90 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  165.70, 163.38, 153.02, 151.43, 142.06, 135.45, 129.31, 128.88, 128.79, 127.79, 127.70, 126.58, 123.97, 116.84, 103.17, 73.13, 69.39, 66.62, 58.61, 53.92, 48.91, 17.73, -1.41. **LC/MS:** berechnet für  $[C_{25}H_{34}N_4O_3Si+H]^+$  483.24, gefunden 483.36.



***N*-(3-(4-methoxy-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid (54b)**

Zu einer Lösung aus *N*-(3-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid (120 mg, 0.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) wurde Trifluoressigsäure (5 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, wässrige KOH-Lösung (1 M, 10 mL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Mischung wurde durch die langsame Zugabe von HCl-Lösung (1 M, 10 mL) neutralisiert, verdünnt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) und Wasser (20 mL) und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flash-säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das Produkt als weißen Feststoff.

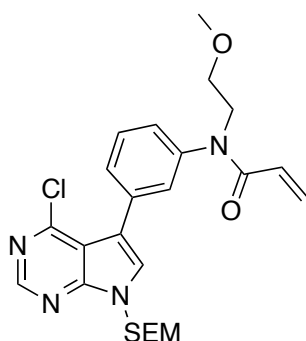
**Ausbeute:** 86% (75 mg, 0.2 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.40 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.42 (dd [app. t], *J* = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 6.18 (dd, *J* = 16.6, 10.3 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 4.02 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.87, 163.56, 153.13, 150.65, 141.97, 135.92, 129.33, 128.83, 127.86, 127.81, 126.37, 124.44, 121.76, 116.29, 103.20, 77.16, 69.40, 58.65, 53.94, 48.94. **HRMS:** *m/z* berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 353.16082, gefunden 353.16184, berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> 375.14276, gefunden 375.14368.



**3-(4-chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin**

Verbindung **56** (200 mg, 0.53 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (8 mL) gelöst und mit  $K_2CO_3$  (221 mg, 1.60 mmol, 3.0 eq), KI (177 mg, 1.07 mmol, 2.0 eq) und 2-Methoxyethyltosylat (98 mg, 0.42 mmol, 0.8 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Wasser gequenchet und mit EtOAc extrahiert. Nachdem das enthaltene DMF durch Waschen mit gesättigter NaCl-Lösung entfernt wurde, wurde die organische Phase über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde durch Flash-säulenchromatographische Aufreinigung als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 24% (54 mg, 0.13 mmol).  **$^1H$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.69 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.12 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 6.55–6.79 (m, 3H), 5.68 (s, 3H), 3.57 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 3.50 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 3.36 (s, 1H), 3.17–3.25 (m, 2H), 0.84 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), -0.10 ppm (s, 9H).  **$^{13}C$  NMR** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  152.6, 151.8, 151.4, 149.3, 133.8, 130.3, 129.4, 118.7, 117.9, 115.2, 114.5, 112.4, 73.8, 71.6, 66.9, 58.9, 43.4, 18.0, -0.5 ppm. **LC/MS:** berechnet für  $[C_{21}H_{29}ClN_4O_2Si+H]^+$  433.18, gefunden 433.00.

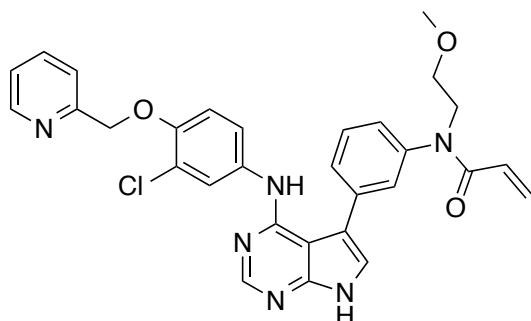


**N-(3-(4-Chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-phenyl)-N-(2-methoxyethyl)acrylamid**

3-(4-chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-N-(2-methoxyethyl)anilin (85 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) wurde in THF (2.5 mL) gelöst und mit DIPEA (0.35 mL, 2.01 mmol, 10.0 eq) versetzt. Bei 0 °C wurde in THF (1.0 mL)

gelöstes Acryloylchlorid (24.4  $\mu\text{L}$ , 0.30 mmol, 1.5 eq) hinzutropft. Die Reaktion wurde für 90 min gerührt, mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gequench und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Flash-säulenchromatographischer Aufreinigung als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 85% (83 mg, 0.17 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.74 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.53–7.57 (m, 2H), 7.43–7.46 (m, 1H), 7.29 (ddd,  $J$  = 5.5, 3.4, 2.1 Hz, 1H), 6.16–6.20 (m, 1H), 5.70 (s, 2H), 5.60 (d,  $J$  = 11.9 Hz, 1H), 3.91 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.56–3.61 (m, 2H), 3.44 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.19 (s, 3H), 0.83–0.87 (m, 2H), -0.09 ppm (s, 9H). **LC/MS:** berechnet für  $[\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{Si}+\text{H}]^+$  487.19, gefunden 487.22.



***N*-(3-(4-((3-Chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidin-5-yl)phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid (55)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift: Anilin-Kupplung durchgeführt. Dabei wurde *N*-(3-(4-Chlor-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-phenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)acrylamid (79 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq), HCl (4 M in Dioxan, 0.25 eq) und 3-chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin (57 mg, 0.2  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) eingesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 69% (62 mg, 0.11 mmol).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500MHz)  $\delta$  12.14–12.23 (m, 1H), 8.57–8.60 (m, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.86 (td,  $J$  = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.80 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 2H), 7.50–7.60 (m, 4H), 7.38–7.43 (m, 2H), 7.35 (dd,  $J$  = 6.7, 5.2 Hz, 1H), 7.10–7.19 (m, 2H), 6.19 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 6.09–6.15 (m, 1H), 5.47 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.84 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 3.39 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.10–3.14 ppm (m, 3H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 126 MHz)  $\delta$  164.8, 157.0, 154.1, 152.5, 151.5, 149.6, 149.2, 142.5, 137.5, 136.9, 134.4, 130.2, 129.5, 128.3, 128.0, 127.9, 126.8, 123.5, 123.0, 123.0, 121.8, 121.3, 121.3, 115.2, 114.7, 101.3, 71.6, 69.1, 58.3, 48.4 ppm. **HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{ClN}_6\text{O}_3+\text{H}]^+$  555.19114, gefunden 555.19091.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359-386.
- [2] A. Thomas, S. V. Liu, D. S. Subramaniam, G. Giaccone. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 511-526.
- [3] S. O. Dolly, D. C. Collins, R. Sundar, S. Popat, T. A. Yap. Advances in the Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Drugs* **2017**, *77*, 813-827.
- [4] J. H. Schiller, D. Harrington, C. P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu, D. H. Johnson, Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 92-98.
- [5] Clinical Lung Cancer Genome Project, Network Genomic Medicine. A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 209ra153.
- [6] J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh. Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 2307-2313.
- [7] W. Pao, K. E. Hutchinson. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 349-351.
- [8] J. Mendelsohn, J. Baselga. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **2000**, *19*, 6550-6565.
- [9] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- [10] M. E. Arcila, K. Nafa, J. E. Chaft, N. Rekhtman, C. Lau, B. A. Reva, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 220-229.
- [11] C. H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
- [12] S. A. Foster, D. M. Whalen, A. Ozen, M. J. Wongchenko, J. Yin, I. Yen, G. Schaefer, J. D. Mayfield, J. Chmielecki, P. J. Stephens, L. A. Albacker, Y. Yan, K. Song, G. Hatzivassiliou, C. Eigenbrot, C. Yu, A. S. Shaw, G. Manning, N. J. Skelton, S. G. Hymowitz, S. Malek. Activation Mechanism

- of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 477-493.
- [13] A. J. Barker, K. H. Gibson, W. Grundy, A. A. Godfrey, J. J. Barlow, M. P. Healy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, L. Scarlett, L. Henthorn, L. Richards. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1911-1914.
- [14] A. E. Wakeling, S. P. Guy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, A. J. Barker, K. H. Gibson. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5749-5754.
- [15] R. T. Dunto, G. M. Keating. Afatinib: first global approval. *Drugs* **2013**, *73*, 1503-1515.
- [16] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K. K. Wong. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.
- [17] J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- [18] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [19] R. Sordella, D. W. Bell, D. A. Haber, J. Settleman. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **2004**, *305*, 1163-1167.
- [20] C. H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K. K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [21] G. Dahl, T. Akerud. Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 697-707.
- [22] T. Barf, A. Kaptein. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6243-6262.

- [23] J. Engel, J. Lategahn, D. Rauh. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 2-5.
- [24] H. A. Yu, M. E. Arcila, N. Rekhtman, C. S. Sima, M. F. Zakowski, W. Pao, M. G. Kris, V. A. Miller, M. Ladanyi, G. J. Riely. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 2240-2247.
- [25] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, H. Varmus. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* **2005**, 2, e73.
- [26] A. Michalczyk, S. Klüter, H. B. Rode, J. R. Simard, C. Grütter, M. Rabiller, D. Rauh. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 3482-3488.
- [27] M. L. Sos, H. B. Rode, S. Heynck, M. Peifer, F. Fischer, S. Klüter, V. G. Pawar, C. Reuter, J. M. Heuckmann, J. Weiss, L. Ruddigkeit, M. Rabiller, M. Koker, J. R. Simard, M. Getlik, Y. Yuza, T. H. Chen, H. Greulich, R. K. Thomas, D. Rauh. Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res.* **2010**, 70, 868-874.
- [28] V. A. Miller, V. Hirsh, J. Cadranel, Y. M. Chen, K. Park, S. W. Kim, C. Zhou, W. C. Su, M. Wang, Y. Sun, D. S. Heo, L. Crino, E. H. Tan, T. Y. Chao, M. Shahidi, X. J. Cong, R. M. Lorence, J. C. Yang. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **2012**, 13, 528-538.
- [29] N. Katakami, S. Atagi, K. Goto, T. Hida, T. Horai, A. Inoue, Y. Ichinose, K. Koboyashi, K. Takeda, K. Kiura, K. Nishio, Y. Seki, R. Ebisawa, M. Shahidi, N. Yamamoto. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 3335-3341.
- [30] D. A. Cross, S. E. Ashton, S. Ghiorghiu, C. Eberlein, C. A. Nebhan, P. J. Spitzler, J. P. Orme, M. R. Finlay, R. A. Ward, M. J. Mellor, G. Hughes, A. Rahi, V. N. Jacobs, M. Red Brewer, E. Ichihara, J. Sun, H. Jin, P. Ballard, K. Al-Kadhimi, R. Rowlinson, T. Klinowska, G. H. Richmond, M. Cantarini, D. W. Kim, M. R. Ranson, W. Pao. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* **2014**, 4, 1046-1061.
- [31] M. R. Finlay, M. Anderton, S. Ashton, P. Ballard, P. A. Bethel, M. R. Box, R. H. Bradbury, S. J. Brown, S. Butterworth, A. Campbell, C. Chorley, N. Colclough, D. A. Cross, G. S. Currie, M. Grist, L. Hassall, G. B. Hill, D. James, M. James, P. Kemmitt, T. Klinowska, G. Lamont, S. G. Lamont, N.

- Martin, H. L. McFarland, M. J. Mellor, J. P. Orme, D. Perkins, P. Perkins, G. Richmond, P. Smith, R. A. Ward, M. J. Waring, D. Whittaker, S. Wells, G. L. Wrigley. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 8249-8267.
- [32] R. A. Ward, M. J. Anderton, S. Ashton, P. A. Bethel, M. Box, S. Butterworth, N. Colclough, C. G. Chorley, C. Chuaqui, D. A. Cross, L. A. Dakin, J. E. Debreczeni, C. Eberlein, M. R. Finlay, G. B. Hill, M. Grist, T. C. Klinowska, C. Lane, S. Martin, J. P. Orme, P. Smith, F. Wang, M. J. Waring. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR). *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 7025-7048.
- [33] P. A. Jänne, J. C. Yang, D. W. Kim, D. Planchard, Y. Ohe, S. S. Ramalingam, M. J. Ahn, S. W. Kim, W. C. Su, L. Horn, D. Haggstrom, E. Felip, J. H. Kim, P. Frewer, M. Cantarini, K. H. Brown, P. A. Dickinson, S. Ghiorghiu, M. Ranson. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372, 1689-1699.
- [34] J.-C. Soria, J. W. Goldman, H. Wakelee, S. Gadgeel, D. R. Camidge, B. Solomon, H. Yu, G. R. Oxnard, S.-H. I. Ou, V. Papadimitrakopoulou, M. Perol, K. Reckamp, A. Varga, R. Dziadziuszko, C. Chouaid, A. Cortot, P. Do, D. Moro-Sibilot, M. Poudenx, D. Despaigne, S. Matheny, L. V. Sequist. Dose optimization of rociletinib for EGFR mutated NSCLC: benefit-risk analysis from the TIGER-X trial, *Konferenz: 18th ECCO – 40th ESMO European Cancer Congress*, **25.09.2015**, in Vienna, Austria.
- [35] G. R. Oxnard, K. Thress, C. Paweletz, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, E. Felip, A. Vivancos, Y. Kuang, L. Sholl, A. J. Redig, M. Cantarini, J. C. Barrett, R. N. Pillai, B. C. Cho, L. Lacroix, D. Planchard, J. C. Soria, P. A. Jänne. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR T790M Positive Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, 10 (suppl 2): ORAL17.07.
- [36] K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Jänne, G. R. Oxnard. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature Med.* **2015**, 21, 560-562.
- [37] A. Oztan, S. Fischer, A. B. Schrock, R. L. Erlich, C. M. Lovly, P. J. Stephens, J. S. Ross, V. Miller, S. M. Ali, S. I. Ou, L. E. Raez. Emergence of EGFR G724S mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma post progression on osimertinib. *Lung Cancer* **2017**, 111, 84-87.
- [38] H. Yasuda, E. Park, C. H. Yun, N. J. Sng, A. R. Lucena-Araujo, W. L. Yeo, M. S. Huberman, D. W. Cohen, S. Nakayama, K. Ishioka, N. Yamaguchi, M. Hanna, G. R. Oxnard, C. S. Lathan, T. Moran, L. V. Sequist, J. E. Chaft, G. J. Riely, M. E. Arcila, R. A. Soo, M. Meyerson, M. J. Eck, S. S. Kobayashi, D. B. Costa. Structural, biochemical, and clinical



- characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 216ra177.
- [39] T. Kosaka, J. Tanizaki, R. M. Paranal, H. Endoh, C. Lydon, M. Capelletti, C. E. Repellin, J. Choi, A. Ogino, A. Calles, D. Ercan, A. J. Redig, M. Bahcall, G. R. Oxnard, M. J. Eck, P. A. Jänne. Response Heterogeneity of EGFR and HER2 Exon 20 Insertions to Covalent EGFR and HER2 Inhibitors. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2712-2721.
- [40] J. Fassunke, F. Müller, M. Keul, S. Michels, M. Dammert, A. Schmitt, D. Plenker, J. Lategahn, C. Heydt, J. Brägelmann, H. L. Tumbrink, Y. Alber, I. Dahmen, R. Fischer, M. Scheffler, M. Ihle, V. Priesner, S. Klein, A. H. Scheel, S. Wagener, A. Kron, K. Frank, K. Garbert, T. Persigehl, M. Püsken, S. Haneder, B. Schaaf, E. Rodermann, W. Engel-Riedel, E. Felip, E. F. Smit, R. K. Thomas, S. Merkelbach-Bruse, H. C. Reinhardt, S. Kast, J. Wolf, D. Rauh, R. Büttner, M. L. Sos. Acquired EGFR-G724S mutation mediates resistance to third-generation and retains sensitivity to second-generation EGFR inhibitors in lung adenocarcinoma patients. *Cancer Discov.* **2018**, *manuscript submitted*.
- [41] M. Yang, X. Xu, J. Cai, J. Ning, J. P. Wery, Q. X. Li. NSCLC harboring EGFR exon-20 insertions after the regulatory C-helix of kinase domain responds poorly to known EGFR inhibitors. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 171-176.
- [42] H. Yasuda, S. Kobayashi, D. B. Costa. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e23-e31.
- [43] I. Alroy, Y. Yarden. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters* **1997**, *410*, 83-86.
- [44] E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin, Y. Yarden. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 5276-5287.
- [45] H. Shigematsu, T. Takahashi, M. Nomura, K. Majmudar, M. Suzuki, H. Lee, Wistuba, II, K. M. Fong, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, J. D. Minna, A. F. Gazdar. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1642-1646.
- [46] P. Stephens, C. Hunter, G. Bignell, S. Edkins, H. Davies, J. Teague, C. Stevens, S. O'Meara, R. Smith, A. Parker, A. Barthorpe, M. Blow, L. Brackenbury, A. Butler, O. Clarke, J. Cole, E. Dicks, A. Dike, A. Drozd, K. Edwards, S. Forbes, R. Foster, K. Gray, C. Greenman, K. Halliday, K. Hills, V. Kosmidou, R. Lugg, A. Menzies, J. Perry, R. Petty, K. Raine, L. Ratford, R. Shepherd, A. Small, Y. Stephens, C. Tofts, J. Varian, S. West, S. Widaa, A. Yates, F. Brasseur, C. S. Cooper, A. M. Flanagan, M. Knowles, S. Y. Leung, D. N. Louis, L. H. Looijenga, B. Malkowicz, M. A. Pierotti, B. Teh, G. Chenevix-Trench, B. L. Weber, S. T. Yuen, G. Harris,

- P. Goldstraw, A. G. Nicholson, P. A. Futreal, R. Wooster, M. R. Stratton. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* **2004**, *431*, 525-526.
- [47] M. E. Arcila, J. E. Chaft, K. Nafa, S. Roy-Chowdhuri, C. Lau, M. Zaidinski, P. K. Paik, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4910-4918.
- [48] K. Aertgeerts, R. Skene, J. Yano, B. C. Sang, H. Zou, G. Snell, A. Jennings, K. Iwamoto, N. Habuka, A. Hirokawa, T. Ishikawa, T. Tanaka, H. Miki, Y. Ohta, S. Sogabe. Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18756-18765.
- [49] H. R. Tsou, E. G. Overbeek-Klumpers, W. A. Hallett, M. F. Reich, M. B. Floyd, B. D. Johnson, R. S. Michalak, R. Nilakantan, C. Discafani, J. Golas, S. K. Rabindran, R. Shen, X. Shi, Y. F. Wang, J. Upeslakis, A. Wissner. Optimization of 6,7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as orally active, irreversible inhibitors of human epidermal growth factor receptor-2 kinase activity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1107-1131.
- [50] A. Wissner, E. Overbeek, M. F. Reich, M. B. Floyd, B. D. Johnson, N. Mamuya, E. C. Rosfjord, C. Discafani, R. Davis, X. Shi, S. K. Rabindran, B. C. Gruber, F. Ye, W. A. Hallett, R. Nilakantan, R. Shen, Y. F. Wang, L. M. Greenberger, H. R. Tsou. Synthesis and structure-activity relationships of 6,7-disubstituted 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles. The design of an orally active, irreversible inhibitor of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2). *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 49-63.
- [51] S. K. Rabindran, C. M. Discafani, E. C. Rosfjord, M. Baxter, M. B. Floyd, J. Golas, W. A. Hallett, B. D. Johnson, R. Nilakantan, E. Overbeek, M. F. Reich, R. Shen, X. Shi, H. R. Tsou, Y. F. Wang, A. Wissner. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3958-3965.
- [52] J. De Greve, E. Teugels, C. Geers, L. Decoster, D. Galdermans, J. De Mey, H. Everaert, I. Umelo, P. In't Veld, D. Schallier. Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer* **2012**, *76*, 123-127.
- [53] L. Gandhi, R. Bahleda, S. M. Tolaney, E. L. Kwak, J. M. Cleary, S. S. Pandya, A. Hollebecque, R. Abbas, R. Ananthakrishnan, A. Berkenblit, M. Krygowski, Y. Liang, K. W. Turnbull, G. I. Shapiro, J. C. Soria. Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 68-75.
- [54] M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S.

- Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, H. Mano. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **2007**, *448*, 561-566.
- [55] T. Sasaki, S. J. Rodig, L. R. Chirieac, P. A. Jänne. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1773-1780.
- [56] J. J. Cui, M. Tran-Dube, H. Shen, M. Nambu, P. P. Kung, M. Pairish, L. Jia, J. Meng, L. Funk, I. Botrous, M. McTigue, N. Grodsky, K. Ryan, E. Padrique, G. Alton, S. Timofeevski, S. Yamazaki, Q. Li, H. Zou, J. Christensen, B. Mroczkowski, S. Bender, R. S. Kania, M. P. Edwards. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6342-6363.
- [57] H. Y. Zou, Q. Li, J. H. Lee, M. E. Arango, S. R. McDonnell, S. Yamazaki, T. B. Koudriakova, G. Alton, J. J. Cui, P. P. Kung, M. D. Nambu, G. Los, S. L. Bender, B. Mroczkowski, J. G. Christensen. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* **2007**, *67*, 4408-4417.
- [58] B. J. Solomon, T. Mok, D. W. Kim, Y. L. Wu, K. Nakagawa, T. Mekhail, E. Felip, F. Cappuzzo, J. Paolini, T. Usari, S. Iyer, A. Reisman, K. D. Wilner, J. Tursi, F. Blackhall, Profile Investigators. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2167-2177.
- [59] M. P. Curran. Crizotinib in Locally Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* **2012**, *72*, 99-107.
- [60] Y. L. Choi, M. Soda, Y. Yamashita, T. Ueno, J. Takashima, T. Nakajima, Y. Yatabe, K. Takeuchi, T. Hamada, H. Haruta, Y. Ishikawa, H. Kimura, T. Mitsudomi, Y. Tanio, H. Mano, A. L. K. L. C. S. Group. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1734-1739.
- [61] T. Sasaki, K. Okuda, W. Zheng, J. Butrynski, M. Capelletti, L. Wang, N. S. Gray, K. Wilner, J. G. Christensen, G. Demetri, G. I. Shapiro, S. J. Rodig, M. J. Eck, P. A. Jänne. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 10038-10043.
- [62] L. Friboulet, N. Li, R. Katayama, C. C. Lee, J. F. Gainor, A. S. Crystal, P. Y. Michellys, M. M. Awad, N. Yanagitani, S. Kim, A. C. Pferdekamper, J. Li, S. Kasibhatla, F. Sun, X. Sun, S. Hua, P. McNamara, S. Mahmood, E. L. Lockerman, N. Fujita, M. Nishio, J. L. Harris, A. T. Shaw, J. A. Engelman. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 662-673.

- [63] S. H. Ignatius Ou, M. Azada, D. J. Hsiang, J. M. Herman, T. S. Kain, C. Siwak-Tapp, C. Casey, J. He, S. M. Ali, S. J. Klempner, V. A. Miller. Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J. Thorac. Oncol.* **2014**, *9*, 549-553.
- [64] R. Katayama, A. T. Shaw, T. M. Khan, M. Mino-Kenudson, B. J. Solomon, B. Halmos, N. A. Jessop, J. C. Wain, A. T. Yeo, C. Benes, L. Drew, J. C. Saeh, K. Crosby, L. V. Sequist, A. J. Iafrate, J. A. Engelman. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 120ra117.
- [65] J. M. Heuckmann, M. Holzel, M. L. Sos, S. Heynck, H. Balke-Want, M. Koker, M. Peifer, J. Weiss, C. M. Lovly, C. Grütter, D. Rauh, W. Pao, R. K. Thomas. ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 7394-7401.
- [66] R. C. Doebele, A. B. Pilling, D. L. Aisner, T. G. Kutateladze, A. T. Le, A. J. Weickhardt, K. L. Kondo, D. J. Linderman, L. E. Heasley, W. A. Franklin, M. Varella-Garcia, D. R. Camidge. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1472-1482.
- [67] I. Sullivan, D. Planchard. Treatment modalities for advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Future Oncol.* **2016**, *12*, 945-961.
- [68] J. Li, W. Liu, H. Luo, J. Bao. Insight into drug resistance mechanisms and discovery of potential inhibitors against wild-type and L1196M mutant ALK from FDA-approved drugs. *J. Mol. Model* **2016**, *22*, 231.
- [69] S. C. Tang, L. N. Nguyen, R. W. Sparidans, E. Wagenaar, J. H. Beijnen, A. H. Schinkel. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1484-1494.
- [70] A. J. Weickhardt, B. Scheier, J. M. Burke, G. Gan, X. Lu, P. A. Bunn, Jr., D. L. Aisner, L. E. Gaspar, B. D. Kavanagh, R. C. Doebele, D. R. Camidge. Local ablative therapy of oligoprogressive disease prolongs disease control by tyrosine kinase inhibitors in oncogene-addicted non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, 1807-1814.
- [71] D. B. Costa, A. T. Shaw, S. H. Ou, B. J. Solomon, G. J. Riely, M. J. Ahn, C. Zhou, S. M. Shreeve, P. Selaru, A. Polli, P. Schnell, K. D. Wilner, R. Wiltshire, D. R. Camidge, L. Crino. Clinical Experience With Crizotinib in Patients With Advanced ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastases. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1881-1888.
- [72] G. Metro, M. Tazza, R. Matocci, R. Chiari, L. Crino. Optimal management of ALK-positive NSCLC progressing on crizotinib. *Lung Cancer* **2017**, *106*, 58-66.

- [73] W. S. Huang, S. Liu, D. Zou, M. Thomas, Y. Wang, T. Zhou, J. Romero, A. Kohlmann, F. Li, J. Qi, L. Cai, T. A. Dwight, Y. Xu, R. Xu, R. Dodd, A. Toms, L. Parillon, X. Lu, R. Anjum, S. Zhang, F. Wang, J. Keats, S. D. Wardwell, Y. Ning, Q. Xu, L. E. Moran, Q. K. Mohemmad, H. G. Jang, T. Clackson, N. I. Narasimhan, V. M. Rivera, X. Zhu, D. Dalgarno, W. C. Shakespeare. Discovery of Brigatinib (AP26113), a Phosphine Oxide-Containing, Potent, Orally Active Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4948-4964.
- [74] S. Zhang, R. Anjum, R. Squillace, S. Nadworny, T. Zhou, J. Keats, Y. Ning, S. D. Wardwell, D. Miller, Y. Song, L. Eichinger, L. Moran, W. S. Huang, S. Liu, D. Zou, Y. Wang, Q. Mohemmad, H. G. Jang, E. Ye, N. Narasimhan, F. Wang, J. Miret, X. Zhu, T. Clackson, D. Dalgarno, W. C. Shakespeare, V. M. Rivera. The Potent ALK Inhibitor Brigatinib (AP26113) Overcomes Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5527-5538.
- [75] A. Markham. Brigatinib: First Global Approval. *Drugs* **2017**, *77*, 1131-1135.
- [76] T. W. Johnson, P. F. Richardson, S. Bailey, A. Brooun, B. J. Burke, M. R. Collins, J. J. Cui, J. G. Deal, Y. L. Deng, D. Dinh, L. D. Engstrom, M. He, J. Hoffman, R. L. Hoffman, Q. Huang, R. S. Kania, J. C. Kath, H. Lam, J. L. Lam, P. T. Le, L. Lingardo, W. Liu, M. McTigue, C. L. Palmer, N. W. Sach, T. Smeal, G. L. Smith, A. E. Stewart, S. Timofeevski, H. Zhu, J. Zhu, H. Y. Zou, M. P. Edwards. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ras oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4720-4744.
- [77] H. Y. Zou, L. Friboulet, D. P. Kodack, L. D. Engstrom, Q. Li, M. West, R. W. Tang, H. Wang, K. Tsaparikos, J. Wang, S. Timofeevski, R. Katayama, D. M. Dinh, H. Lam, J. L. Lam, S. Yamazaki, W. Hu, B. Patel, D. Bezwada, R. L. Frias, E. Lifshits, S. Mahmood, J. F. Gainor, T. Affolter, P. B. Lappin, H. Gukasyan, N. Lee, S. Deng, R. K. Jain, T. W. Johnson, A. T. Shaw, V. R. Fantin, T. Smeal. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 70-81.
- [78] T. Kubo, H. Yamamoto, W. W. Lockwood, I. Valencia, J. Sob, M. Peyton, M. Jida, H. Otani, T. Fujii, M. Ouchida, N. Takigawa, K. Kiura, K. Shimizu, H. Date, J. D. Minna, M. Varella-Garcia, W. L. Lam, A. F. Gazdar, S. Toyooka. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1778-1784.
- [79] H. Koeppen, W. Yu, J. Zha, A. Pandita, E. Penuel, L. Rangell, R. Raja, S. Mohan, R. Patel, R. Desai, L. Fu, A. Do, V. Parab, X. Xia, T. Januario, S. G. Louie, E. Filvaroff, D. S. Shames, I. Wistuba, M. Lipkind, J. Huang, M.

- Lazarov, V. Ramakrishnan, L. Amler, S. C. Phan, P. Patel, A. Peterson, R. L. Yauch. Biomarker analyses from a placebo-controlled phase II study evaluating erlotinib+/-onartuzumab in advanced non-small cell lung cancer: MET expression levels are predictive of patient benefit. *Clin. Cancer Res.* **2014**, 20, 4488-4498.
- [80] G. M. Frampton, S. M. Ali, M. Rosenzweig, J. Chmielecki, X. Lu, T. M. Bauer, M. Akimov, J. A. Bufill, C. Lee, D. Jentz, R. Hoover, S. H. Ou, R. Salgia, T. Brennan, Z. R. Chalmers, S. Jaeger, A. Huang, J. A. Elvin, R. Erlich, A. Fichtenholtz, K. A. Gowen, J. Greenbowe, A. Johnson, D. Khaira, C. McMahon, E. M. Sanford, S. Roels, J. White, J. Greshock, R. Schlegel, D. Lipson, R. Yelensky, D. Morosini, J. S. Ross, E. Collisson, M. Peters, P. J. Stephens, V. A. Miller. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* **2015**, 5, 850-859.
- [81] B. Melosky. Current Treatment Algorithms for Patients with Metastatic Non-Small Cell, Non-Squamous Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, 7, 38.
- [82] M. A. J. Iafoffa, R. A. Juergens. Update on Programmed Death-1 and Programmed Death-Ligand 1 Inhibition in the Treatment of Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, 7, 67.
- [83] A. Somasundaram, T. F. Burns. The next generation of immunotherapy: keeping lung cancer in check. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, 10, 87.
- [84] R. M. Poole. Pembrolizumab: first global approval. *Drugs* **2014**, 74, 1973-1981.
- [85] G. M. Keating. Nivolumab: A Review in Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* **2016**, 76, 969-978.
- [86] A. Markham. Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs* **2016**, 76, 1227-1232.
- [87] T. S. K. Mok, H. H. Loong. Are we ready for immune checkpoint inhibitors for advanced non-small-cell lung cancer? *The Lancet* **2016**, 387, 1488-1490.
- [88] R. S. Herbst, P. Baas, D.-W. Kim, E. Felip, J. L. Pérez-Gracia, J.-Y. Han, J. Molina, J.-H. Kim, C. D. Arvis, M.-J. Ahn, M. Majem, M. J. Fidler, G. de Castro, M. Garrido, G. M. Lubiniecki, Y. Shentu, E. Im, M. Dolled-Filhart, E. B. Garon. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet* **2016**, 387, 1540-1550.
- [89] Y. Jia, C. H. Yun, E. Park, D. Ercan, M. Manuia, J. Juarez, C. Xu, K. Rhee, T. Chen, H. Zhang, S. Palakurthi, J. Jang, G. Lelais, M. DiDonato, B. Bursulaya, P. Y. Michellys, R. Epple, T. H. Marsilje, M. McNeill, W. Lu, J. Harris, S. Bender, K. K. Wong, P. A. Jänne, M. J. Eck. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature* **2016**, 534, 129-132.

- [90] K. Uchibori, N. Inase, M. Araki, M. Kamada, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita, R. Katayama. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Comm.* **2017**, *8*, 14768.
- [91] J. Jang, J. B. Son, C. To, M. Bahcall, S. Y. Kim, S. Y. Kang, M. Mushajiang, Y. Lee, P. A. Janne, H. G. Choi, N. S. Gray. Discovery of a potent dual ALK and EGFR T790M inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 497-510.
- [92] Y. Chen, J. Wu, A. Wang, Z. Qi, T. Jiang, C. Chen, F. Zou, C. Hu, W. Wang, H. Wu, Z. Hu, W. Wang, B. Wang, L. Wang, T. Ren, S. Zhang, Q. Liu, J. Liu. Discovery of N-(5-((5-chloro-4-((2-(isopropylsulfonyl)phenyl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methoxy-2-(4-methyl-1,4-diazepan-1-yl)phenyl)acrylamide (CHMFL-ALK/EGFR-050) as a potent ALK/EGFR dual kinase inhibitor capable of overcoming a variety of ALK/EGFR associated drug resistant mutants in NSCLC. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 674-697.
- [93] G. Lelais, R. Epple, T. H. Marsilje, Y. O. Long, M. McNeill, B. Chen, W. Lu, J. Anumolu, S. Badiger, B. Bursulaya, M. DiDonato, R. Fong, J. Juarez, J. Li, M. Manuia, D. E. Mason, P. Gordon, T. Groessl, K. Johnson, Y. Jia, S. Kasibhatla, C. Li, J. Isbell, G. Spraggon, S. Bender, P. Y. Michellys. Discovery of (R,E)-N-(7-Chloro-1-(1-[4-(dimethylamino)but-2-enoyl]azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylisonicotinamide (EGF816), a Novel, Potent, and WT Sparing Covalent Inhibitor of Oncogenic (L858R, ex19del) and Resistant (T790M) EGFR Mutants for the Treatment of EGFR Mutant Non-Small-Cell Lung Cancers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6671-6689.
- [94] Y. Jia, J. Juarez, J. Li, M. Manuia, M. J. Niederst, C. Tompkins, N. Timple, M. T. Vaillancourt, A. C. Pferdekamper, E. L. Lockerman, C. Li, J. Anderson, C. Costa, D. Liao, E. Murphy, M. DiDonato, B. Bursulaya, G. Lelais, J. Barretina, M. McNeill, R. Epple, T. H. Marsilje, N. Pathan, J. A. Engelman, P. Y. Michellys, P. McNamara, J. Harris, S. Bender, S. Kasibhatla. EGF816 Exerts Anticancer Effects in Non-Small Cell Lung Cancer by Irreversibly and Selectively Targeting Primary and Acquired Activating Mutations in the EGF Receptor. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 1591-1602.
- [95] F. Gonzalvez, X. Zhu, W.-S. Huang, T. E. Baker, Y. Ning, S. D. Wardwell, S. Nadworny, S. Zhang, B. Das, Y. Gong, M. T. Greenfield, H. G. Jang, A. Kohlmann, F. Li, P. M. Taslimi, M. Tugnait, Y. Xu, E. Y. Ye, W. W. Youngsaye, S. G. Zech, Y. Zhang, T. Zhou, N. I. Narasimhan, D. C. Dalgarno, W. C. Shakespeare, V. M. Rivera. Abstract 2644: AP32788, a potent, selective inhibitor of EGFR and HER2 oncogenic mutants, including exon 20 insertions, in preclinical models. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2644-2644.
- [96] clinicaltrials.gov (Identifier: NCT02716116). A Trial of AP32788 in Non-Small Cell Lung Cancer. (25.01.2018).

- [97] M. Y. Cha, K. O. Lee, M. Kim, J. Y. Song, K. H. Lee, J. Park, Y. J. Chae, Y. H. Kim, K. H. Suh, G. S. Lee, S. B. Park, M. S. Kim. Antitumor activity of HM781-36B, a highly effective pan-HER inhibitor in erlotinib-resistant NSCLC and other EGFR-dependent cancer models. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2445-2454.
- [98] Y. Y. Elamin, J. P. Robichaux, V. K. Lam, A. Tsao, C. Lu, G. Blumenschein, J. Kurie, J. R. Brahmer, S. Li, T. Chen, A. Estrada-Bernal, A. Truini, M. Nilsson, A. T. Le, Z. Tan, S. Zhang, R. C. Doebele, K. Politi, Z. Yang, S. Liu, K.-K. Wong, J. V. Heymach. The Preclinical and Clinical Activity of Poziotinib, a Potent, Selective Inhibitor of EGFR Exon 20 Mutant NSCLC, *Konferenz: IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer)*, **18.10.2017**, in Yokohama, Japan.
- [99] G. Caravatti, J. Brüggén, E. Buchdunger, R. Cozens, P. Furet, N. Lydon, T. O'Reilly, P. Traxler. Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine and Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Derivatives as Selective Inhibitors of the EGF Receptor Tyrosine Kinase. In *Anticancer Agents*, American Chemical Society: **2001**, 796, 231-244.
- [100] S. J. Kaspersen, C. Sorum, V. Willassen, E. Fuglseth, E. Kjobli, G. Bjorkoy, E. Sundby, B. H. Hoff. Synthesis and in vitro EGFR (ErbB1) tyrosine kinase inhibitory activity of 4-N-substituted 6-aryl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-4-amines. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6002-6014.
- [101] J. Lategahn. Design und Synthese kovalenter Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors zur Umgehung der Wirkstoff-Resistenz T790M. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2013**.
- [102] H. Tumbrink. Zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren der ErbB-Familie. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2016**.
- [103] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchya, Y. Takahashi, R. Masuma. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1977**, *30*, 275-282.
- [104] M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J. P. Hunt, D. J. Lockhart, Z. V. Milanov, M. J. Morrison, G. Pallares, H. K. Patel, S. Pritchard, L. M. Wodicka, P. P. Zarrinkar. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132.
- [105] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, W. P. Parks. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417-1423.
- [106] G. T. Merlino, Y. H. Xu, S. Ishii, A. J. Clark, K. Semba, K. Toyoshima, T. Yamamoto, I. Pastan. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* **1984**, *224*, 417-419.



- [107] M. Brower, D. N. Carney, H. K. Oie, A. F. Gazdar, J. D. Minna. Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 798-806.
- [108] R. Diaz, P. A. Nguewa, R. Parrondo, C. Perez-Stable, I. Manrique, M. Redrado, R. Catena, M. Collantes, I. Penuelas, J. A. Diaz-Gonzalez, A. Calvo. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 188.
- [109] A. M. Udager, D. C. M. Rolland, J. B. McHugh, B. L. Betz, C. Murga-Zamalloa, T. E. Carey, L. J. Marentette, M. A. Hermsen, K. E. DuRoss, M. S. Lim, K. S. J. Elenitoba-Johnson, N. A. Brown. High-Frequency Targetable EGFR Mutations in Sinonasal Squamous Cell Carcinomas Arising from Inverted Sinonasal Papilloma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2600-2606.
- [110] C. Garcia-Inclan, A. Lopez-Hernandez, M. Alonso-Guervos, E. Allonca, S. Potes, S. Melon, F. Lopez, J. L. Llorente, M. Hermsen. Establishment and genetic characterization of six unique tumor cell lines as preclinical models for sinonasal squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4925.
- [111] S. Sakiyama, Y. Nakamura, S. Yasuda. Expression of epidermal growth factor receptor gene in cultured human lung cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **1986**, *77*, 965-969.
- [112] M. Warmuth, S. Kim, X. J. Gu, G. Xia, F. Adrian. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, *19*, 55-60.
- [113] L. Girard, S. Zöchbauer-Müller, A. K. Virmani, A. F. Gazdar, J. D. Minna. Genome-wide Allelotyping of Lung Cancer Identifies New Regions of Allelic Loss, Differences between Small Cell Lung Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer, and Loci Clustering. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4894-4906.
- [114] S. E. Wang, A. Narasanna, M. Perez-Torres, B. Xiang, F. Y. Wu, S. Yang, G. Carpenter, A. F. Gazdar, S. K. Muthuswamy, C. L. Arteaga. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 25-38.
- [115] M. Y. Park, M. H. Jung, E. Y. Eo, S. Kim, S. H. Lee, Y. J. Lee, J. S. Park, Y. J. Cho, J. H. Chung, C. H. Kim, H. I. Yoon, J. H. Lee, C. T. Lee. Generation of lung cancer cell lines harboring EGFR T790M mutation by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Oncotarget* **2017**, *8*, 36331-36338.
- [116] J. D. Moyer, E. G. Barbacci, K. K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M. J. Morin, M. P. Moyer, M. Neveu, V. A. Pollack, L. R. Pustilnik, M. M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, P. Miller. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4838-4848.

- [117] P. Traxler, P. R. Allegrini, R. Brandt, J. Brueggen, R. Cozens, D. Fabbro, K. Grosios, H. A. Lane, P. McSheehy, J. Mestan, T. Meyer, C. Tang, M. Wartmann, J. Wood, G. Caravatti. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4931-4941.
- [118] J. B. Smaill, G. W. Rewcastle, J. A. Loo, K. D. Greis, O. H. Chan, E. L. Reyner, E. Lipka, H. D. H. Showalter, P. W. Vincent, W. L. Elliott, W. A. Denny. Tyrosine Kinase Inhibitors. 17. Irreversible Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor: 4-(Phenylamino)quinazoline- and 4-(Phenylamino)pyrido[3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides Bearing Additional Solubilizing Functions. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1380-1397.
- [119] W. Xia, R. J. Mullin, B. R. Keith, L. H. Liu, H. Ma, D. W. Rusnak, G. Owens, K. J. Alligood, N. L. Spector. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* **2002**, *21*, 6255-6263.
- [120] A. O. Walter, R. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, M. Sheets, T. St Martin, R. Karp, D. van Kalken, P. Chaturvedi, D. Niu, M. Nacht, R. C. Petter, W. Westlin, K. Lin, S. Jaw-Tsai, M. Raponi, T. Van Dyke, J. Etter, Z. Weaver, W. Pao, J. Singh, A. D. Simmons, T. C. Harding, A. Allen. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 1404-1415.
- [121] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- [122] W. Zhou, D. Ercan, P. A. Jänne, N. S. Gray. Discovery of selective irreversible inhibitors for EGFR-T790M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 638-643.
- [123] Z. Pan, H. Scheerens, S. J. Li, B. E. Schultz, P. A. Sprengeler, L. C. Burrill, R. V. Mendonca, M. D. Sweeney, K. C. Scott, P. G. Grothaus, D. A. Jeffery, J. M. Spoerke, L. A. Honigberg, P. R. Young, S. A. Dalrymple, J. T. Palmer. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 58-61.
- [124] L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. Sirisawad, E. Verner, D. Loury, B. Chang, S. Li, Z. Pan, D. H. Thamm, R. A. Miller, J. J. Buggy. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 13075-13080.
- [125] J. Engel, S. Smith, J. Lategahn, H. L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J. G. Hengstler, D. Rauh. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to

- Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7725-7744.
- [126] J. Engel. Strukturbasiertes Design und Entwicklung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der EGFR-T790M-Wirkstoffresistenz im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. *Dissertation, TU Dortmund* **2018**.
- [127] S. Smith. Design, Synthese und massenspektrometrische Analyse kovalenter und kovalent-reversibler Kinaseinhibitoren. *Dissertation, TU Dortmund* **2017**.
- [128] L. Goebel. Synthese und Charakterisierung kovalenter Inhibitoren zur Umgehung der EGFR-Doppelmutante T790M. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [129] E. Hennes. Strukturbasiertes Design und Synthese kovalenter Kinase-Inhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [130] J. Engel, C. Becker, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [131] S. Smith, M. Keul, J. Engel, D. Basu, S. Eppmann, D. Rauh. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega* **2017**, *2*, 1563-1575.
- [132] D. Basu, A. Richters, D. Rauh. Structure-based design and synthesis of covalent-reversible inhibitors to overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2767-2780.
- [133] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty. The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307-317.
- [134] C. Becker. Charakterisierung von Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzellen. *Dissertation, TU Dortmund* **2016**.
- [135] S. Tomassi, J. Lategahn, J. Engel, M. Keul, H. L. Tumbrink, J. Ketzer, T. Mühlenberg, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, S. Bauer, D. Rauh. Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2361-2372.
- [136] J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh. Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6844-6863.
- [137] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C. H. Yun, Q. W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat. Structure-guided development of

- affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 229-238.
- [138] M. Chartier, T. Chenard, J. Barker, R. Najmanovich. Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree. *PeerJ* **2013**, *1*, e126.
- [139] M. Günther, J. Lategahn, M. Juchum, E. Döring, M. Keul, J. Engel, H. L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer. Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5613-5637.
- [140] M. Günther, M. Juchum, G. Kelter, H. Fiebig, S. Laufer. Lung Cancer: EGFR Inhibitors with Low Nanomolar Activity against a Therapy-Resistant L858R/T790M/C797S Mutant. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10890-10894.
- [141] I. Landel. Aufreinigung und Kristallisation der Rezeptor-Tyrosin-Kinase EGFR. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [142] M. Flaßhoff. Synthese kovalenter Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors mit verbesserter Löslichkeit. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [143] P. Klövekorn. Synthese optimierter Inhibitoren für Mutanten der ErbB-Familie basierend auf dem Pyrrolopyrimidin- und Pyrrolopyrimidin-4-on-Grundgerüst. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2015**.
- [144] Y. H. Peng, H. Y. Shiao, C. H. Tu, P. M. Liu, J. T. Hsu, P. K. Amancha, J. S. Wu, M. S. Coumar, C. H. Chen, S. Y. Wang, W. H. Lin, H. Y. Sun, Y. S. Chao, P. C. Lyu, H. P. Hsieh, S. Y. Wu. Protein kinase inhibitor design by targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) motif: the role of the DFG motif in the design of epidermal growth factor receptor inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3889-3903.
- [145] T. Grabe. Synthese kovalenter Inhibitoren für mutierte Kinasen der ErbB-Familie. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2017**.
- [146] Y. Wang, L. Wang, S. Guan, W. Cao, H. Wang, Z. Chen, Y. Zhao, Y. Yu, H. Zhang, J. C. Pang, S. L. Huang, Y. Akiyama, Y. Yang, W. Sun, X. Xu, Y. Shi, H. Zhang, E. S. Kim, J. A. Muscal, F. Lu, J. Yang. Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19423.
- [147] A. V. Galkin, J. S. Melnick, S. Kim, T. L. Hood, N. Li, L. Li, G. Xia, R. Steensma, G. Chopiuk, J. Jiang, Y. Wan, P. Ding, Y. Liu, F. Sun, P. G. Schultz, N. S. Gray, M. Warmuth. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 270-275.
- [148] T. H. Marsilje, W. Pei, B. Chen, W. Lu, T. Uno, Y. Jin, T. Jiang, S. Kim, N. Li, M. Warmuth, Y. Sarkisova, F. Sun, A. Steffy, A. C. Pferdekamper, A. G. Li, S. B. Joseph, Y. Kim, B. Liu, T. Tuntland, X. Cui, N. S. Gray, R.

- Steensma, Y. Wan, J. Jiang, G. Chopiuk, J. Li, W. P. Gordon, W. Richmond, K. Johnson, J. Chang, T. Groessl, Y. Q. He, A. Phimister, A. Aycinena, C. C. Lee, B. Bursulaya, D. S. Karanewsky, H. M. Seidel, J. L. Harris, P. Y. Michellys. Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo efficacy of the novel potent and selective anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 5-chloro-N2-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl)phenyl)-N4-(2-(isopropylsulfonyl)phenyl)pyrimidine-2,4-diamine (LDK378) currently in phase 1 and phase 2 clinical trials. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5675-5690.
- [149] H. Sakagami, S. Konagai, H. Yamamoto, H. Tanaka, T. Matsuya, M. Mori, H. Koshio, M. Yuri, M. Hirano, S. Kuromitsu. Abstract 1728: ASP8273, a novel mutant-selective irreversible EGFR inhibitor, inhibits growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells with EGFR activating and T790M resistance mutations. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 1728-1728.
- [150] S. Konagai, H. Sakagami, H. Yamamoto, H. Tanaka, T. Matsuya, S. Mimasu, Y. Tomimoto, M. Mori, H. Koshio, M. Hirano, S. Kuromitsu, M. Takeuchi. Abstract 2586: ASP8273 selectively inhibits mutant EGFR signal pathway and induces tumor shrinkage in EGFR mutated tumor models. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2586-2586.
- [151] A. Pardanani, J. R. Gotlib, C. Jamieson, J. E. Cortes, M. Talpaz, R. M. Stone, M. H. Silverman, D. G. Gilliland, J. Shorr, A. Tefferi. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 789-796.
- [152] A. Pardanani, J. Hood, T. Lasho, R. L. Levine, M. B. Martin, G. Noronha, C. Finke, C. C. Mak, R. Mesa, H. Zhu, R. Soll, D. G. Gilliland, A. Tefferi. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* **2007**, *21*, 1658-1668.
- [153] N. Ramsden, J. Perrin, Z. Ren, B. D. Lee, N. Zinn, V. L. Dawson, D. Tam, M. Bova, M. Lang, G. Drewes, M. Bantscheff, F. Bard, T. M. Dawson, C. Hopf. Chemoproteomics-based design of potent LRRK2-selective lead compounds that attenuate Parkinson's disease-related toxicity in human neurons. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1021-1028.
- [154] M. W. Eugen Lounkine, Anne Mai Wassermann, and Jürgen Bajorath. SARANEA: A Freely Available Program To Mine Structure-Activity and Structure-Selectivity Relationship Information in Compound Data Sets. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 68-78.



## Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Lategahn, Jonas

Name, Vorname  
(Surname, first name)

128 852

Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

### Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuchs kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

### Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, 3.5.18

Ort, Datum  
(Place, date)

  
Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Design, Synthese und zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren

onkogener und Wirkstoff-resistenter Mutanten der ErbB-Familie

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund, 3.5.18

Ort, Datum  
(Place, date)

  
Unterschrift  
(Signature)